

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004037

International filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-059513
Filing date: 03 March 2004 (03.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

02.03.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 3月 3日

出願番号
Application Number: 特願 2004-059513

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2004-059513

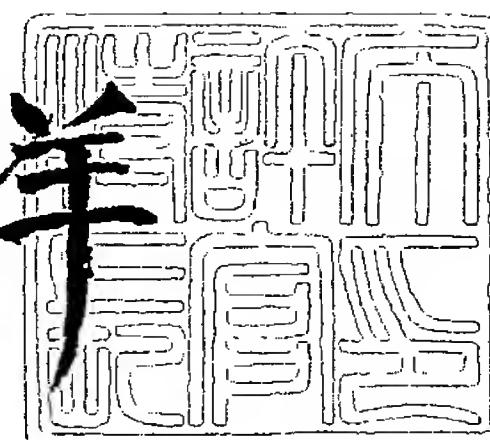
出願人
Applicant(s):

国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学
財団法人地球環境産業技術研究機構
学校法人近畿大学

2005年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 C01J1255
【提出日】 平成16年 3月 3日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 5/10
A01H 5/10
C12N 15/09
C07K 14/415

【発明者】
【住所又は居所】 奈良県生駒市西松ヶ丘 1 1 - 3 7 - 1 0 8
【氏名】 横田 明穂

【発明者】
【住所又は居所】 大阪府堺市金岡町 1 2 6 4 - 3 1
【氏名】 重岡 成

【発明者】
【住所又は居所】 京都府相楽郡木津町木津川台 9 - 2 地球環境産業技術研究機構
【氏名】 富澤 健一

【特許出願人】
【識別番号】 598169457
【氏名又は名称】 奈良先端科学技術大学院大学長

【特許出願人】
【識別番号】 591178012
【氏名又は名称】 財団法人地球環境産業技術研究機構

【特許出願人】
【識別番号】 000125347
【氏名又は名称】 学校法人近畿大学

【代理人】
【識別番号】 100077012
【弁理士】
【氏名又は名称】 岩谷 龍

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 066372
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0315195
【物件名】 委任状 2
【提出物件の特記事項】 同日補充する。

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

リブローヌー 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子とアセチル CoA カルボキシラーゼのサブユニット遺伝子の間にフルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ又は/及びセドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントを含んだ光合成活性を高める発現カセットを有する遺伝子組み換えベクター。

【請求項 2】

フルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質が、次のいずれかである請求項 1 に記載のベクター；

- (a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- (b) 配列表の配列番号 1 において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつフルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質；又は
- (c) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上の相同性を有し、かつフルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 3】

フルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかの DNA からなる遺伝子である、請求項 1 に記載のベクター；

- (a) 配列表の配列番号 2 に記載の塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列表の配列番号 2 において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつフルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA；又は
- (c) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつフルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA；又は
- (d) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 60% 以上の相同性を有し、かつフルクトースー 1, 6-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA。

【請求項 4】

セドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質が、次のいずれかである請求項 1 に記載のベクター；

- (a) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；
- (b) 配列表の配列番号 3 において、1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつセドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質；又は
- (c) 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 60% 以上の相同性を有し、かつセドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 5】

セドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかの DNA からなる遺伝子である、請求項 1 に記載のベクター；

- (a) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列からなる DNA；
- (b) 配列表の配列番号 4 において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつセドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA；又は
- (c) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつセドヘプツローヌー 1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA；又は
- (d) 配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 60% 以上の相

同性を有し、かつセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。

【請求項6】

フルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質が、次のいずれかである請求項1に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号5において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつフルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質；又は

(c) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有し、かつフルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項7】

フルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、請求項1に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列表の配列番号6において、1又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつフルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(c) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつフルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA；又は

(d) 配列表の配列番号6に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも60%以上の相同性を有し、かつフルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA。

【請求項8】

発現カセットが、フルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ又は／及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAフラグメントの翻訳開始点の上流にリボゾーム結合部位を有することを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のベクター。

【請求項9】

発現カセットが、リボゾーム結合部位の上流にプロモーター及び、フルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ又は／及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAフラグメントの下流にターミネーターを有することを特徴とする請求項8に記載のベクター。

【請求項10】

プロモーター及びターミネーターがそれぞれタバコ葉緑体由来のプロモーター及びターミネーターであることを特徴とする請求項9に記載のベクター。

【請求項11】

リブローサー1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子とアセチルCoAカルボキシラーゼのサブユニット遺伝子がそれぞれタバコ由来の遺伝子である請求項1～10のいずれかに記載のベクター。

【請求項12】

タバコ由来のリブローサー1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子とアセチルCoAカルボキシラーゼのサブユニット遺伝子の間にフルクトースー1, 6-ビスホスファターゼ又は／及びセドヘプツロースー1, 7-ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAフラグメントを有し、

前記 DNA フラグメントの翻訳開始点の上流にリボゾーム結合部位を有し、さらに、前記リブローヌー 1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ大サブユニット遺伝子とリボゾーム結合部位の間にタバコ由来のプロモーターを有し、前記アセチル CoA カルボキシラーゼのサブユニット遺伝子と DNA フラグメントの間にタバコ由来のターミネーター有する発現カセットを有する遺伝子組み換えベクター。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載のベクターを葉緑体に導入した形質転換葉緑体。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の形質転換葉緑体を有する植物。

【請求項 1 5】

植物がタバコである請求項 1 4 に記載の植物。

【書類名】明細書

【発明の名称】葉緑体工学による植物の生産性を向上させる方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、光合成活性が高く、特に二酸化炭素の固定に優れた形質転換植物に関するものである。

【背景技術】

【0 0 0 2】

植物は光合成を行い、大気中の二酸化炭素を固定し生物のエネルギー源となる糖や有機物を合成する。植物において、大気中の二酸化炭素を固定し、二酸化炭素から糖を合成する過程はカルビンサイクルと呼ばれる。カルビンサイクルでは、光のエネルギーを必要とせず、以下の2つの段階に分けられている。第1段階は、リブロース-1, 5-ビスリン酸 (R u B P) と二酸化炭素から3-ホスホグリセリン酸 (P G A) が合成され、さらにこれが還元されてグリセルアルデヒド-3-リン酸 (G A P) が合成される過程である。第2段階は合成されたG A Pの一部は糖 (光合成生成物) の合成に使われ、残りのG A Pは、フルクトース1, 6-ビスリン酸 (F B P) からフルクトース6-リン酸 (F 6 P)、セドヘプツロース1, 7-ビスリン酸 (S B P)、セドヘプツロース7-リン酸 (S 7 P)、リボース5-リン酸などを経てR u B Pに再生される過程である。この時、R u B PからP G Aの合成、すなわちカルビンサイクルへの二酸化炭素の取り込みはリブロース-1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (以下、R u b i s c oと略称する。) によって触媒される。第2段階においては、アルドラーゼ [G A Pとジヒドロキシアセトンリン酸 (D H A P) からF B Pへの反応と、D H A P及びエリトロース4-リン酸 (E 4 P) からS B Pへの反応をそれぞれ可逆的に触媒する酵素]、フルクトース1, 6-ビスホスファターゼ (F B P a s e ; F B PからF 6 Pへの反応を触媒する酵素)、セドヘプツロース1, 7-ビスホスファターゼ (S B P a s e ; S B PからS 7 Pへの反応を触媒する酵素)、トランスケトラーゼが律速酵素として代謝反応を担っている。

カルビンサイクルで作用する多くの酵素は、二酸化炭素固定の連続した反応を維持するのに必要とされるレベル以上に存在するものもある。しかしF B P a s e及びS B P a s eはカルビンサイクルで重要な律速酵素でありながら、そのレベルは、カルビンサイクルの他の酵素に比較して極端に低いことが知られている (非特許文献1)。

このため、光合成能を高めるトランスジェニック植物として、植物の葉に特有の葉肉細胞から得られるサイトゾルのフルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ遺伝子 (c y - F B P アーゼ遺伝子) を永続的に特異的に発現させるプロモーターを有するベクター及び、該ベクターにより形質転換されたトランスジェニック植物が報告されている (特許文献1 ; W O 9 8 / 1 8 9 4 0)。

また、ラン藻 *S y n e c h o c o c c u s* P C C 7 9 4 2 遺伝子由来のF B P / S B P a s eを高等植物の葉緑体中で形質発現させる方法が報告されている。この方法によると、形質転換された植物は野生株に比べ高い光合成活性を持ち、生育が促進されることが知られている (特許文献2、非特許文献1参照)。

【0 0 0 3】

しかし、上記のいずれの形質転換体も、遺伝子を用いて構築されたプラスミドをアグロバクテリウム ツメファシエンスに導入し、葉ディスクに感染させることによって、各遺伝子を葉核ゲノムに導入されるものである。このため、植物に導入された遺伝子の発現タンパク質は、葉緑体に移行する確率が低かった。

また、核ゲノムへの異種遺伝子の導入は、導入した人工改変遺伝子が交雑、交配等により環境へ拡散していく懸念がある。さらに、このようにして導入された遺伝子の発現は不安定で、植物体ごとに発現量、ひいてはその効果は大きく異なる。

【0 0 0 4】

高等植物の葉緑体は、成葉1細胞あたり100個程度存在し、葉緑体1個あたり100コピーの葉緑体ゲノム遺伝子が存在する (非特許文献2参照)。

このことは、もし1コピーの外来遺伝子を葉緑体ゲノムに挿入した場合、形質転換体においては細胞あたり1万コピー存在することになり、コピー数の多さから導入遺伝子の高発現が期待できる（非特許文献3参照。）。

さらに、葉緑体への遺伝子導入は相同組み換えを利用するため、核への挿入時に見られる位置効果がおこらず、安定した遺伝子発現が行われる。また、葉緑体は母性遺伝をするため、導入した遺伝子の花粉を介した環境への飛散を防ぐことができる等、葉緑体への遺伝子導入は利点が多いと考えられている。

目的タンパク質を葉緑体において高度に発現させることができる発現ベクター、及び該発現ベクターを用いて形質転換させた形質転換葉緑体、該形質転換葉緑体を有する植物が知られている。この発現ベクターは、*psbA*プロモーターと、タンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点の上流にリボゾーム結合部位を有することを特徴としている。本方法は、薬理活性を有するタンパク質、医薬品工業用材料等として有用なタンパク質を、微生物による製造に換えて、植物を使用して製造することを目的としたものである。該実施例において、緑蛍光蛋白の遺伝子を用いて形質転換された植物に、その蛋白の発現が確認されている（特許文献3参照。）。

しかし、本文献には、植物において光合成活性や二酸化炭素の固定を改善すること等についての記載はなく、またカルビンサイクルの律速酵素である *FBPase* 又は *SBPase*、或いはそれらの遺伝子についての記載も認められない。

【特許文献1】国際公開第WO98/18940号パンフレット

【特許文献2】特開2000-253768号公報

【特許文献3】特開2002-272476号公報

【非特許文献2】アーカイブス・オブ・バイオテクノロジー・アンド・バイオフィジックス (Archives of Biotechnology and Biophysics)、1996年、第334巻、p. 27-36

【非特許文献1】ミヤガワ (Miyagawa) ら、ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotechnology) 2001年、第19巻、p. 965-969

【非特許文献2】ベンディッヒ・エー・ジェイ (Bendich, A. J.)、バイオエッセイズ (BioEssays)、1987年、第6巻、p. 279-282

【非特許文献3】マリガ・ピー (Maliga, P.)、トレンドズ・イン・バイオテクノロジー (Trends in biotechnology)、1993年、第11巻、p. 101-107

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、高等植物中で光合成、特にカルビンサイクルに関与する酵素の遺伝子を形質発現させることによって、野生株に比べ高い光合成活性を持ち、生育が促進される形質転換植物を作成することである。より、詳しくは葉緑体DNAにカルビンサイクル反応を律速している酵素の遺伝子を導入し、光合成能が増強された形質転換葉緑体を有する植物を作成することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、*FBPase* 又は / 及び *SBPase* を有するタンパク質を高等植物の葉緑体中で確実に発現させることができる形質転換技術を見出した。また形質転換された植物は高い光合成活性を有するのみならず、より大きな植物体を有する植物に成長することを見出した。本発明は、これらの知見を基礎として更に種々研究を重ね完成されたものである。

すなわち、本発明は、

(1) *Rubisco* 大サブユニットとアセチルCoAカルボキシラーゼのサブユニット遺伝子の間に *FBPase* 又は / 及び *SBPase* 活性を有するタンパク質をコードす

る遺伝子を含むDNAフラグメントを含んだ光合成活性を高める発現カセットを有する遺伝子組み換えベクター、

(2) FBPase活性を有するタンパク質が、次のいずれかである上記(1)に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号1において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつFBPase活性を有するタンパク質；又は

(c) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有し、かつFBPase活性を有するタンパク質、

(3) FBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、上記(1)に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列表の配列番号2において、1又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつFBPase活性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(c) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつFBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA；又は

(d) 配列表の配列番号1に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも60%以上の相同性を有し、かつFBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA、

(4) SBPase活性を有するタンパク質が、次のいずれかである上記(1)に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号3において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつSBPase活性を有するタンパク質；又は

(c) 配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有し、かつSBPase活性を有するタンパク質、

(5) SBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、上記(1)に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるDNA；

(b) 配列表の配列番号4において、1又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつSBPase活性を有するタンパク質をコードするDNA；又は

(c) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつSBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA；又は

(d) 配列表の配列番号4に記載の塩基配列を有するDNAと少なくとも60%以上の相同性を有し、かつSBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNA、

(6) FBPase及びSBPase活性を有するタンパク質が、次のいずれかである上記(1)に記載のベクター；

(a) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b) 配列表の配列番号5において、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつFBPase及びSBPase活性を有するタンパク質；又は

(c) 配列表の配列番号5に記載のアミノ酸配列と少なくとも60%以上の相同性を有し、かつFBPase及びSBPase活性を有するタンパク質、

(7) FBPase及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、次のいずれかのDNAからなる遺伝子である、上記(1)に記載のベクター；

- (a) 配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列からなる DNA ;
- (b) 配列表の配列番号 6 において、1 又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつ FBPase 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする DNA ; 又は
- (c) 配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列を有する DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ FBPase 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA ; 又は
- (d) 配列表の配列番号 6 に記載の塩基配列を有する DNA と少なくとも 60 % 以上の相同性を有し、かつ FBPase 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなる DNA、
- (8) 発現カセットが、FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントの翻訳開始点の上流にリボゾーム結合部位を有することを特徴とする上記 (1) ~ (7) のいずれかに記載のベクター、
- (9) 発現カセットが、リボゾーム結合部位の上流にプロモーター及び、FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントの下流にターミネーターを有することを特徴とする上記 (8) に記載のベクター、
- (10) プロモーター及びターミネーターがそれぞれタバコ葉緑体由来のプロモーター及びターミネーターであることを特徴とする上記 (9) に記載のベクター、
- (11) Rubisco 大サブユニット遺伝子とアセチル CoA カルボキシラーゼのサブユニット遺伝子がそれぞれタバコ由来の遺伝子である上記 (1) ~ (10) のいずれかに記載のベクター、
- (12) タバコ由来の Rubisco 大サブユニット遺伝子とアセチル CoA カルボキシラーゼのサブユニット遺伝子の間に FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントを有し、前記 DNA フラグメントの翻訳開始点の上流にリボゾーム結合部位を有し、さらに、前記 Rubisco 大サブユニット遺伝子とリボゾーム結合部位の間にタバコ由来のプロモーターを有し、前記アセチル CoA カルボキシラーゼのサブユニット遺伝子と DNA フラグメントの間にタバコ由来のターミネーターを有する発現カセットを有する遺伝子組み換えベクター、
- (13) 上記 (1) ~ (12) のいずれかに記載のベクターを葉緑体に導入した形質転換葉緑体、
- (14) 上記 (13) に記載の形質転換葉緑体を有する植物、及び
- (15) 植物がタバコである上記 (14) に記載の植物、
- に関する。

また、本発明は葉緑体 DNA の遺伝子間の非コード領域に FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントを挿入し、形質転換された葉緑体を有する植物を生産する方法に関する。

【発明の効果】

【0007】

本発明のベクターは、確実に高等植物の葉緑体へ、FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質を導入できる。本発明のベクターにより形質転換された植物は、カルビンサイクルの律速酵素である FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質の発現が増強されるので、野生株よりも光合成能が強化される。この結果、本発明の形質転換植物は、野生株に比べて、糖、デンプンの合成能力が増大し得る。また、本発明の形質転換植物は、背丈が大きく、また葉の面積も大きく、茎も太くなり、早く生育し得る。したがって、本発明のベクターを用いた形質転換植物の栽培は、早生、高収量植物を作出する上で非常に有効な手段となり得る。

本発明の形質転換植物は、FBPase 又は / 及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が核ゲノムではなく、葉緑体ゲノムに直接導入されるため、導入された遺伝子の花粉による拡散の恐れがない。すなわち、例えば核に遺伝子が導入された植物のように、花粉が風や昆虫により広範囲に撒き散らされ、動植物界への悪影響を与える

等の環境汚染の心配がない。また、系統間で発現が安定している。また、葉緑体ゲノムに直接導入された本発明の形質転換植物は、核に遺伝子が導入された形質転換植物に比較して、糖、デンプンの合成能力が増大し、背丈、葉が大きくなり、早生、高収量植物に生育し得る。

組み換えDNA技術を利用して、高等植物の一次代謝である光合成の機能を改善し、早生、収穫量の増大が可能であるので、将来の食料危機に対応する上で極めて重要な技術となり得る。

また、本発明の形質転換植物は、光合成のうち、特に二酸化炭素固定に重要な役目を果たすカルビンサイクルの律速酵素が増強される。このため、本発明の形質転換植物は、大気中の二酸化炭素の取り込み率を高め、大気中の二酸化炭素濃度を低減できるので、該植物の栽培は、地球温暖化の抑制にも貢献できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質は、カルビンサイクルの律速酵素となり得るタンパク質である。該タンパク質は、FBPase又はSBPaseのいずれの酵素活性を有するものであっても、また両方の酵素活性を併せ持つものであってもよい。特に、高等植物では、カルビンサイクルの一連の反応において、その反応の全体としての速度を支配するペースメーカー酵素となり得るSBPaseの酵素活性を有するタンパク質並びに、FBPase及びSBPaseの両活性を有するタンパク質（以下、FBP／SBPaseと略称する。）が好ましい。

【0009】

FBPase活性を有する蛋白質としては、例えば配列番号1で示されるアミノ酸配列を挙げることができる。また、SBPase活性を有する蛋白質としては、例えば配列番号3で示されるアミノ酸配列を挙げることができる。FBP／SBPase活性を示すタンパク質としては、例えば配列番号5で示されるラン藻由来のFBP／SBPaseのアミノ酸配列を挙げることができる。本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質には、上記各アミノ酸配列のうち、1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入されたアミノ酸配列を有し、かつそれぞれFBPase活性、SBPase活性、又はFBP／SBPase活性を有するタンパク質も含まれる。さらに、本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質には、配列番号1、3又は5に記載のアミノ酸配列と、それぞれ少なくとも60%以上の相同性を有するタンパク質、好ましくは80%以上の相同性を有するタンパク質、より好ましくは90%以上の相同性を有するタンパク質、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するタンパク質であって、かつそれぞれFBPase活性、SBPase活性、又はFBP／SBPase活性を有するタンパク質も含まれる。

なお、本明細書でアミノ酸配列について「相同」というときは、タンパク質の一次構造を比較し、配列間において各々の配列を構成するアミノ酸残基の一致の程度の意味で用いる。

また、アミノ酸配列について、「1又は数個（2～6個程度）のアミノ酸が欠失、置換、付加もしくは挿入」というときは、部位特異的突然変異誘発法などの周知の技術的方法により、または天然に生じうる程度の数が、欠失、置換、付加又は挿入などされていることを意味する。

【0010】

本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むDNAフラグメントとしては、FBPase、SBPase、FBP／SBPaseの各酵素をコードするDNA及び前記各酵素の活性部位を有するタンパク質をコードするDNAをいう。FBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列としては、例えば配列番号2に示されるDNA配列が挙げられる。SBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列としては、例えば配列番号4に示されるDNA配列が挙げられる。FBP／SBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配

列としては、例えば配列番号6に示されるDNA配列が挙げられる。本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードするDNAフラグメントには、上記した配列番号2、4又は6に示されるDNA配列において、1又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入された塩基配列を有し、かつFBPase活性、SBPase活性、又はFBP／SBPase活性を有するタンパク質をコードするDNAが含まれる。塩基配列について、「1又は数個の塩基が欠失、置換、付加もしくは挿入」というときは、部位特異的突然変異誘発法などの周知の技術的方法により、または天然に生じうる程度の数（1～数個）の塩基が、欠失、置換、付加もしくは挿入などされていることを意味する。

【0011】

また、本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードするDNAフラグメントには、上記した配列番号2、4又は6に示される各DNA配列と、それぞれ相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつそれぞれFBPase活性、SBPase活性、又はFBP／SBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAが含まれる。ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、上記DNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得られるDNAを意味する。ストリンジェントな条件とは、例えば、塩濃度、0.1～2倍程度の濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる。）、温度約65℃程度でのハイブリダイズ条件をいう。

【0012】

さらに本発明に使用されるFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードするDNAフラグメントには、上記した配列番号2、4又は6に示される各DNA配列と、それぞれ少なくとも60%以上の相同性を有し、かつそれぞれFBPase活性、SBPase活性、又はFBP／SBPase活性を有するタンパク質をコードする塩基配列からなるDNAが含まれる。相同性を有するDNAとは、ハイストリンジェントな条件において、少なくとも約60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは約80%以上の相同性を有するDNA、より好ましくは、約90%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するDNAをいう。なお、ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM程度、好ましくは約19～20mM程度で、温度が約50～70℃程度、好ましくは約60～65℃程度の条件をいう。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃程度の場合が最も好ましい条件である。

なお、以下、FBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードするDNAフラグメント、並びに上記ハイブリダイズするDNA及び相同性を有するDNAを被導入遺伝子ともいう。

【0013】

本発明の発現カセットは、葉緑体DNA中に相同的組換えによって、確実に導入されるように、被導入遺伝子の5' - 及び3' - 側に、葉緑体DNAの遺伝子〔例えば、trnG (tRNA-Gly (GCC))、trnV (tRNA-Val (GAC))、trnfM (tRNA-fMet (CAU))、rbcL遺伝子、accD遺伝子、trnI (tRNA-Ile (GAU))とtrnA (tRNA-Ala (UGU))、3' rps12 (リボソーマルプロテインS12エクソン-3) 遺伝子、trnV (tRNA-Val (GAC)) 等〕配列と相補的塩基対をつくる塩基配列を付加したものである。相補的塩基対をつくる塩基配列は、葉緑体DNAの遺伝子と相補的塩基対をつくる相同的部分を有する、約500～1500程度の塩基配列を有する配列であれば、好ましく用いることができる。このような塩基配列としては、葉緑体DNAの遺伝子と実質的に同一の配列、葉緑体DNAの遺伝子の部分配列と実質的に同一の配列、又は葉緑体DNAの遺伝子と実質的に同一の配列を含む配列に対する相補的な塩基配列が挙げられる。

また、被導入遺伝子の導入位置から約1000～1500程度の塩基配列を有し、葉緑体DNAの遺伝子（例えば、trnG、trnfM、rbcL遺伝子、accD遺伝子、trnI、trnA、3' rps12遺伝子、trnV等）と相補的塩基対をつくるものであれば、上記葉緑体DNAの遺伝子配列に限定されない。

この時、葉緑体DNAの塩基配列は、外来遺伝子が導入されること以外、変化がないことが肝要である。外来遺伝子の導入先となる葉緑体DNAの塩基配列は、すでにNCBIのデータベースに登録され、開示されている（登録番号：NC 001879）。葉緑体DNA中に被導入遺伝子が導入される位置は、好ましくは葉緑体DNAの遺伝子のtrnGとtrnfMの間、rbcL遺伝子とaccD遺伝子の間、trnIとtrnAの間、3' rps12遺伝子とtrnVの間であり、それぞれの遺伝子から十分な距離を置いた非コード領域が望ましい。前記十分な距離とは、遺伝子から少なくとも50塩基以上、好ましくは約100～1000塩基程度、より好ましくは約200～500塩基程度である。該非コード領域は、葉緑体DNA上のいずれの非コード領域であってもよい。

以下に、rbcL遺伝子とaccD遺伝子を使用した発現カセットにつき、より詳細に説明する。

【0014】

光合成活性を高める発現カセットを構成するrbcL遺伝子は、葉緑体ゲノムにコードされているRubiscoの遺伝子である。Rubiscoは、光合成CO₂固定反応回路（カルビンサイクル）において、初発段階であるCO₂固定反応（カルボキシラーゼ反応）を触媒し、回路における代謝回転の律速となる鍵酵素である。また、該酵素は酸素（O₂）を固定する反応（オキシゲナーゼ反応）も触媒する。本発明における葉緑体由来のrbcL遺伝子としては、タバコ葉緑体由来のrbcL遺伝子を好ましく用いることができる。

【0015】

光合成活性を高める発現カセットを構成するaccD遺伝子は、葉緑体ゲノムにコードされているアセチルCoAカルボキシラーゼの遺伝子である。アセチルCoAカルボキシラーゼは、植物において脂肪酸合成に関与している酵素である。本発明における葉緑体由来のaccD遺伝子としては、タバコ葉緑体由来のaccD遺伝子を好ましく用いることができる。

葉緑体由来のrbcL遺伝子と葉緑体由来のaccD遺伝子とを有する発現カセットを用いることにより、FBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が、相同組換えにより葉緑体に組み込まれやすくなり、さらに葉緑体でのFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質の発現量が多くなるという利点がある。

なお、rbcL遺伝子とaccD遺伝子はそれらの全長を使う必要はない。例えばrbcL遺伝子とaccD遺伝子との間の非コード領域の、被導入遺伝子の導入位置からrbcL遺伝子側又はaccD遺伝子側にそれぞれ約1000～1500程度の塩基対の長さを有し、rbcL遺伝子又はaccD遺伝子とそれぞれ相同的組換えし得る配列であればよい。

【0016】

また、光合成活性を高める発現カセットは、FBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAフラグメントの翻訳開始点の上流に、リボゾーム結合部位を有することが好ましい。該DNAフラグメントの上流にリボゾーム結合部位を置くことにより、該タンパク質を高度に発現させることができる。該リボゾーム結合部位はタンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点に連続して上流にあってもよいが、翻訳開始点の約7～11塩基程度上流にあることが好ましく、9塩基程度上流にあることがさらに好ましい。かかるリボゾーム結合部位は、リボゾームが結合できることが知られている自体公知の塩基配列を有していればよいが、SD配列が好ましい。SD配列は、Shine-Dalgarno sequenceの略称であり、4～7個のヌクレオチドからなるセグメントであって、その塩基配列は5'-AGGAGGU-3'（配列

番号 18) の一部又は全部である。

【0017】

光合成活性を高める発現カセットには、上記リボゾーム結合部位の上流にさらに、植物細胞由来のプロモーターを有することが好ましい。該プロモーターは、リボゾーム結合部位の上流であれば、リボゾーム結合部位に連続してもよく、約 1～30 塩基程度上流にあってもよい。該プロモーターとしては、例えば、エロンゲーションファクター 1 α 遺伝子のプロモーター (EF 1 α プロモーター)、35S プロモーター、psbA プロモーター、PPDK プロモーター、PsPAL1 プロモーター、PAL プロモーター、UBIZM1 ユビキチンプロモーター、rrn プロモーター等が挙げられる。中でも、葉緑体由来のプロモーターが好ましく、タバコ葉緑体由来のプロモーターがより好ましく、例えば配列表の配列番号 7 で記載されたタバコ葉緑体由来の psbA プロモーター等を特に好ましく用いることができる。

【0018】

光合成活性を高める発現カセットには、FBPase 又は／及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントと accD 遺伝子の間に植物由来のターミネーターを有することが好ましい。該ターミネーターは、DNA フラグメントの下流であれば、DNA フラグメントに連続してもよく、約 1～30 塩基程度下流にあってもよい。該ターミネーターとしては、例えば 35S ターミネーター、rps16 ターミネーター、CaMV 35S ターミネーター、ORF 25 polyA 転写ターミネーター、psbA ターミネーター等が挙げられる。中でも、葉緑体由来のターミネーターが好ましく、タバコ葉緑体由来のターミネーターがより好ましく、タバコ葉緑体由来の rps16 ターミネーターが最も好ましく、例えば配列表の配列番号 8 で記載されたタバコ葉緑体由来の rps16 ターミネーターを好ましく用いることができる。

【0019】

また、発現カセットには、遺伝子組換え体を識別するための遺伝子を有することが好ましい。遺伝子組換え体を識別するための遺伝子としては、特に限定されず、自体公知のものを好んでよい。例えば、各種の薬剤耐性遺伝子 (aadA)、又は宿主の栄養要求性を相補する遺伝子などが挙げられる。より具体的には、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子 (G418 耐性)、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、URA3 遺伝子等が挙げられる。より具体的には、例えば配列表の配列番号 9 に記載されたスペクチノマイシン耐性遺伝子などを好ましく用いることができる。また、該遺伝子の上流及び下流には、それぞれ該遺伝子を認識するためのプロモーター (以下、aadA プロモーターと略記する。) 及び該遺伝子のターミネーター (以下、aadA ターミネーターと略記する。) を配することが好ましい。該 aadA プロモーター及び aadA ターミネーターは、上記した植物由来のプロモーター及びターミネーターを好ましく使用できるが、rrn プロモーター及び psbA ターミネーターが特に好適である。aadA プロモーター／aadA／aadA ターミネーターを aadA カセットということもある。

遺伝子組換え体を識別するための aadA カセットは、rbcL 遺伝子とリボゾーム結合部位の上流にあるプロモーターとの間に配することが好ましい。

【0020】

本発明のベクターに使用される発現カセットは、5'側から rbcL 遺伝子、aadA カセット、プロモーター、リボソーム結合部位、FBPase 又は／及び SBPase 活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメント、ターミネーター及び accD 遺伝子の順序に構築されることが好ましい。各 DNA 間は連続していてもよく、各 DNA の間に例えばイントロン配列等が挿入されていてもよい。

【0021】

本発明における遺伝子組換えベクターは、例えば以下の工程により作成することができる。

まず、pLD6 ベクターを作成する工程である。かかるベクターは、実施例の〔工程 1

〕に記載の方法で容易に作製することができる。pLD6の全塩基配列を配列番号10に示した。pLD6は、pLD6のNotIとSalIの切断部位に構築遺伝子群を挿入する。構築遺伝子群は、(a) 配列番号11で表される塩基配列を有するマルチクロニング領域（配列番号10中の3698-3748に位置する）と、その上流に配列番号7で表されるタバコ葉緑体由来のpsbAプロモーター（配列番号10中の3569-3701に位置する）と、マルチクロニング領域の下流に配列番号8で表されるタバコ葉緑体由来のrps16ターミネーター（配列番号10中の3755-3913に位置する）とからなる群と、その群の上流に(b) 遺伝子組換え体を識別するための遺伝子としての配列番号9で表されるスペクチノマイシン耐性遺伝子であるaadA遺伝子（配列番号10中の2369-3173に位置する）と、aadA遺伝子の上流に配列番号12で表されるタバコ葉緑体由来のrrnプロモーター（配列番号10中の2227-2368に位置する）と、aadA遺伝子の下流に配列番号13で表されるタバコ葉緑体由来のpsbAターミネーター（配列番号10中の3175-3564に位置する）とを有している。上記マルチクロニング領域の制限酵素認識部位（BglII、SphI、ClaI及びEcoRI）に、FBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を挿入する。より具体的には、pLD6ベクターのマルチクロニング領域のSphIとEcoRIの切断部位に例えば配列番号2で示されるハウレンソウ由来のFBPaseをコードする遺伝子又は配列番号4で示されるハウレンソウ由来のSBPaseをコードする遺伝子、あるいはラン草由来の配列番号6で示されるFBP／SBPaseをコードする遺伝子等を挿入する。この場合、配列番号の第13～17位の塩基配列（5'-aggag-3'）がSD配列に相当し、リボソーム結合部位として働く。以下、FBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が挿入された構築遺伝子群をFBP／SBP遺伝子群、該遺伝子群を挿入されたpLD6ベクターをpLD6-FBP／SBPと称する。

【0022】

次いで、pLD6-FBP／SBPを適当な宿主細胞に導入し、かかる宿主細胞を培養して、FBP／SBP遺伝子群をクロニングする。

宿主細胞は、自体公知の宿主細胞から適宜選択でき、具体的には、例えばエシェリヒア属菌やバチルス属菌などの原核生物、酵母や糸状菌などの真核生物、植物細胞又は動物細胞等が挙げられる。また、宿主細胞の培養条件は、宿主細胞の種類に応じて当業界で通常行われている条件に従えば良い。また、クロニングされた遺伝子にFBPase又は／及びSBPase活性を有するタンパク質をコードする遺伝子がうまく導入されたか否かは、pLD6-FBP／SBPが有する選択マーカー等に基づき容易に判別することができる。

【0023】

次いで、pLD200ベクターを作成する工程である。かかるベクターは、実施例の〔工程2〕に記載の方法で容易に作製することができる。先の工程のpLD6-FBP／SBPを用いてクロニングされた遺伝子組換え体から、NotI及びSalIを用いてFBP／SBP遺伝子群を切り出し、該切り出した遺伝子群をpLD200のポリリンカーのNotIとSalIの切断部位に挿入する。pLD200の全塩基配列を配列番号14に記載した。上記ポリリンカーは配列番号17で表される塩基配列（配列番号14の2125-2145に位置する）を有し、複数の制限酵素部位（NotI、NheI及びSalI）を有する。pLD200ベクターは、ポリリンカーとその上流に配列番号15で表される塩基配列を有するタバコ葉緑体由来のrbcl遺伝子（配列番号14中の423-1856に位置する。）と、その下流に配列番号16で表される塩基配列を有するタバコ葉緑体由来のaccD遺伝子（配列番号14中の2624-3328に位置する。）からなる発現カセットを有することを特徴とするベクターである。このようにしてFBP／SBP遺伝子群が挿入されたpLD200ベクターをpLD200-FBP／SBPと称する。

上記ベクターは、自体公知のクロニングベクターに、複数の制限酵素部位を有するポ

リリンカー（好ましくは配列番号 1 7 で表される塩基配列の遺伝子）と、ポリリンカーの上流にタバコ葉緑体由来の *r b c L* 遺伝子と、ポリリンカーの下流にタバコ葉緑体由来の *a c c D* 遺伝子とを挿入することにより得ることもできる。

【0 0 2 4】

このようにして作製された上記 *p L D 2 0 0 - F B P / S B P* を宿主細胞に導入し、形質転換体を作製する。このとき、宿主細胞としては、植物細胞が好ましく、葉緑体がより好ましく、タバコ葉緑体がさらに好ましい。このように、植物細胞、特に葉緑体を宿主細胞として用いることにより、導入した遺伝子がコードするタンパク質を高発現させることができ、さらに導入した遺伝子の花粉を介した環境への飛散を防ぐことができる等の利点がある。

【0 0 2 5】

p L D 2 0 0 - F B P / S B P a s e を宿主細胞、特に葉緑体へ導入して形質転換する方法としては、公知の方法を用いてよい。例えば、該発現ベクターを金又はタングステンの極めて細かい粒子にまぶし、この該発現ベクターの付着した粒子を火薬又は高圧ガスで宿主細胞に打ち込み該発現ベクターを導入するというパーティクルガン法などが挙げられる。中でも、高等植物の葉緑体への遺伝子導入系はパーティクルガンによる手法（S v a b, Z., H a j d u k i e w i c z, P., and M a l i g a, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990年, 第87巻, p. 8526-8530）または、PEGによる手法（G o l d s, T., M a l i g a, P., and K o o p, H.-U., Bio/Technol., 1993年, 第11巻, p. 95-97）を用いるのが好ましい。

【0 0 2 6】

本発明に係る上記形質転換葉緑体を有する植物は、自体公知の方法によって得ることができる。ここで、上記植物は特に限定されないが、高等植物が好ましく、タバコがより好ましい。タバコとしては、ニコチアナ・アキユミネート（*N i c o t i a n a a c u m i n a t e*）、ニコチアナ・アラタ（*N i c o t i a n a a l a t a*）、ニコチアナ・アテヌエイタ（*N i c o t i a n a a t t e n u a t a*）、ニコチアナ・クレベランディイ（*N i c o t i a n a c l e v e l a n d i i*）、ニコチアナ・エクセルシオール（*N i c o t i a n a e x c e l s i o r*）、ニコチアナ・フォルゲティアナ（*N i c o t i a n a f o r g e t i a n a*）、ニコチアナ・ゴッセイ（*N i c o t i a n a g o s s e i*）、ニコチアナ・グラウカ（*N i c o t i a n a g l a u c a*）、ニコチアナ・ルティノサ（*N i c o t i a n a g l u t i n o s a*）、ニコチアナ・ラングスドルフィー（*N i c o t i a n a l a n g s d o r f f i i*）、ニコチアナ・ロンギフロラ（*N i c o t i a n a l o n g i f l o r a*）、ニコチアナ・オブツシホリア（*N i c o t i a n a o b t u s i f o l i a*）、ニコチアナ・パニユキュレータ（*N i c o t i a n a p a n i c u l a t a*）、ニコチアナ・プルムバギホリア（*N i c o t i a n a p l u m b a g i f o l i a*）、ニコチアナ・クアドリバリビス（*N i c o t i a n a q u a d r i v a l v i s*）、ニコチアナ・レパンダ（*N i c o t i a n a r e p a n d a*）、ニコチアナ・ルスチカ（*N i c o t i a n a r u s t i c a*）、ニコチアナ・サンデラエ（*N i c o t i a n a s a n d e r a e*）、ニコチアナ・スーベオレンス（*N i c o t i a n a s u a v e o l e n s*）、ニコチアナ・シルベストリス（*N i c o t i a n a s y l v e s t r i s*）、ニコチアナ・タバカム（*N i c o t i a n a t a b a c u m*）、ニコチアナ・トメントサ（*N i c o t i a n a t o m e n t o s a*）、ニコチアナ・トメントシホルミス（*N i c o t i a n a t o m e n t o s i f o r m i s*）などが挙げられる。中でもニコチアナ・ルスチカ及びニコチアナ・タバカムが好ましい。特にニコチアナ・タバカムが好適であり、ニコチアナ・タバカムのうちの「バーレー種」、「黄色種（バージニア種）」、「在来種」、「オリエント種」がとりわけ好ましい。

上記植物はその植物に応じた自体公知の条件で生育させることができる。

【0 0 2 7】

なお、上記の遺伝子工学又は生物工学の操作については、市販の実験書、例えば、1982年発行のモレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、1989年発行のモレキュラー・クローニング第2版 (Molecular Cloning, 2nd ed.) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) 等に記載された方法に従って容易に行うことができる。

本発明に係るタバコ葉緑体ゲノム中への遺伝子導入用ベクターの構築の過程で利用したベクターの pLD6 及び pLD200 については、特願 2001-083569 で公開されている。

以下に具体的実施例を挙げ、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに特に限定されることはない。

なお、実施例で使用する各略号の意味は、次のとおりである。

S. 7942 : *Synechococcus* PCC 7942

LB 培地 : Luria-Bertani 培地

NaCl : 塩化ナトリウム

【実施例】

【0028】

遺伝子組み換え体の作成

〔工程1〕 pLD6-S. 7942 FBP/SBPase の作成

配列表の配列番号2で表される S. 7942 FBP/SBPase 遺伝子 (fbp/sbp) をタバコ葉緑体において高発現が期待できる psbA プロモーター (PpsbA) をもつベクター pLD6 の制限酵素 SphI と EcoRI 部位の間に挿入し、pLD6-S. 7942 FBP/SBPase を作成した。この、pLD6-S. 7942 FBP/SBPase を常法に従い大腸菌に導入した。この大腸菌を、スペクチノマイシンを添加した LB 培地で 37℃ 下、16 時間培養し、かかる遺伝子が導入された大腸菌を選択した。選択された大腸菌を同様の条件で培養し、その後遠心分離により集菌し、常法に従い pLD6-S. 7942 FBP/SBPase (プラスミド DNA) を精製した。なお、LB 培地 1 L 中の組成は、10 g トリプトン、5 g 酵母エキス、5 g NaCl である。

【0029】

〔工程2〕 pLD200-S. 7942 FBP/SBPase の作成]

工程1で精製した pLD6-S. 7942 FBP/SBPase を制限酵素 NotI 及び SalI で処理した後、S. 7942 FBP/SBPase を含む断片を NotI 上流と SalI 下流にタバコ葉緑体ゲノムの rbcL 遺伝子の一部と accD 遺伝子の一部を含む葉緑体形質転換用ベクター pLD200 の NotI と SalI 部位の間に挿入し、pLD200-S. 7942 FBP/SBPase を作成した。この、pLD200-S. 7942 FBP/SBPase を常法に従い大腸菌に導入した。この大腸菌を、スペクチノマイシンを添加した LB 培地で 37℃ 下、16 時間培養し、かかる遺伝子が導入された大腸菌を選択した。選択された大腸菌を同様の条件で培養し、その後遠心分離により集菌し、常法に従い pLD200-S. 7942 FBP/SBPase (プラスミド DNA) を精製した (図1)。

【0030】

〔工程3〕葉緑体形質転換体の作成

精製した pLD200-S. 7942 FBP/SBPase をパーティクルガンによりタバコ葉緑体に導入し、葉緑体形質転換体を作成した。タバコ葉緑体形質転換は既知の方法 (Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P., Stable transformation of plastids in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8526-8530 (1990)) によった。

【0031】

スペクチノマイシン添加培地上での再分化後、PCRにより葉緑体ゲノム中にS. 7942FBP/SBPaseの導入された形質転換体(pTp sbAFS) 6系統を得ることが出来た。自家交配により作出したT₁世代においても遺伝子の脱落は認められなかった(図2)。抗S. 7942FBP/SBPase抗体を用い、ウエスタンブロッティングを行った結果、形質転換植物(pTp sbAFS)においてのみ、S. 7942FBP/SBPaseの分子質量に一致する約40kDaの位置にシグナルが認められ、FBP/SBPaseが高発現していることが明らかになった(図3)。

【0032】

播種10週及び18週後の植物を用い、FBPase活性の測定を行ったところ、野生株に比べ、形質転換植物では約10-40倍高いFBPase活性を有していた(図4)。

播種12週後のT₁世代を用い、CO₂濃度360ppm条件下における光強度変化による光合成活性を測定した。その結果を図5に示した。形質転換体(pTp sbAFS-3及びpTp sbAFS-9)および野生株(Wild-type)は、光強度約500μmol/m²/sで光合成速度がマキシマムとなり、以後その速度を維持した。マキシマムにおける形質転換体の光合成速度は、野生株の約2倍であった。

また、比較として、特開2000-253768号公報(特許文献2)に記載の方法によりS. 7942FBP/SBPaseを連結したプラスミドをアグロバクテリウム・ツメファシエンスLBA4404に導入し、タバコのリーフディスクに感染させた形質転換体(TpFS-3及びTpFS-6)を作成した。TpFS-3及びTpFS-6は、野生株に比較し、マキシマムにおける光合成速度は約1.2~1.3倍程度で、pTp sbAFS-3及びpTp sbAFS-9の光合成速度より、非常に低かった。このことは、本発明の形質転換体は、野生株及び従来法による形質転換植物に比較して、光合成活性が非常に亢進していることを示すものである。

また、pTp sbAFS-3及びpTp sbAFS-9は光強度約200μmol/m²/sで、野生株のマキシマムと、300μmol/m²/sで、TpFS-3及びTpFS-6のマキシマムと同程度の光合成速度を示した。このことは、本発明の形質転換植物は、光強度が低い場合でも、十分な光合成活性を有することを示すものである。

播種18週目の形質転換体の生育を野生株と比較したところ、野生株に比べ形質転換植物では明らかに生育が促進されており、最終的な生育は野生株の1.2~1.3倍に達した(図6、7)。また、形質転換体では野生株に比べ茎が太くなっており、根も著しく発達していた(図8)。さらに、生育18週後の形質転換体は野生株の約1.5となった。

このように、S. 7942FBP/SBPase遺伝子をタバコ葉緑体ゲノムに導入することで、植物の光合成能を向上させることができた。さらにそのことにより、生育を促進させ、収穫量を増やすことが可能となった。

【産業上の利用可能性】

【0033】

本発明の遺伝子組み換え体を用いて形質転換された植物は、光合成活性が高く、早生、高収量作物として有用である。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は発現ベクターpLD200-S. 7942FBP/SBPaseを示す図である。

【図2】図2はPCRによる遺伝子導入の確認を示す図である。図中、Wは野生株を示す。

【図3】図3は播種後10週目の植物における導入遺伝子及び発現タンパク質の確認を示す図である。図中、Wは野生株を示す。

【図4】図4は播種後10週及び18週目における上葉、下葉におけるFBPase活性の比較を示す図である。図中、縦軸はFBPase活性を示す。

【図5】図5は播種10週目の光合成活性を示す図である。

【図6】図6は生育の速度を示す図である。図中、縦軸は植物の高さ(cm)を示す

。

【図 7】 図 7 は播種 1 8 週間後の植物を示す図である。

【図 8】 図 8 は播種 1 8 週間後の植物における茎及び根を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Sequence Listing

<110> Nara Institute of Science and Technology, Research Institute of Innovative
Technology for the Earth

<120> Transgenic plants

<130> C01J1255

<160> 17

<210> 1

<211> 358

<212> PRT

<213> Spinacia oleracea L

<220> Fructose-1,6-bisphosphatase

<223>

<400> 1

Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Thr	Lys	Ala	Arg	Thr	Arg	Ser	5	10	15
Lys	Tyr	Glu	Ile	Glu	Thr	Leu	Thr	Gly	Trp	Leu	Leu	Lys	Gln	Glu	Met	20	25	30
Ala	Gly	Val	Ile	Asp	Ala	Glu	Leu	Thr	Ile	Val	Leu	Ser	Ser	Ile	Ser	35	40	45
Leu	Ala	Cys	Lys	Gln	Ile	Ala	Ser	Leu	Val	Gln	Arg	Ala	Gly	Ile	Ser	50	55	60
Asn	Leu	Thr	Gly	Ile	Gln	Gly	Ala	Val	Asn	Ile	Gln	Gly	Glu	Asp	Gln	65	70	75
Lys	Lys	Leu	Asp	Val	Val	Ser	Asn	Glu	Val	Phe	Ser	Ser	Cys	Leu	Arg	85	90	95
Ser	Ser	Gly	Arg	Thr	Gly	Ile	Ile	Ala	Ser	Glu	Glu	Glu	Asp	Val	Pro	100	105	110
Val	Ala	Val	Glu	Glu	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ile	Val	Val	Phe	Asp	115	120	125
Pro	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	Ala	Val	Ser	Thr	Gly	Ser	130	135	140
Ile	Phe	Gly	Ile	Tyr	Ser	Pro	Asn	Asp	Glu	Cys	Ile	Val	Asp	Ser	Asp	145	150	155
His	Asp	Asp	Glu	Ser	Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Glu	Gln	Arg	Cys	Val	Val	165	170	175
Asn	Val	Cys	Gln	Pro	Gly	Asp	Asn	Leu	Leu	Ala	Ala	Gly	Tyr	Cys	Met	180	185	190
Tyr	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Phe	Val	Leu	Thr	Ile	Gly	Lys	Gly	Val	Tyr	195	200	205
Ala	Phe	Thr	Leu	Asp	Pro	Met	Tyr	Gly	Glu	Phe	Val	Leu	Thr	Ser	Glu	210	225	220
Lys	Ile	Gln	Ile	Pro	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Tyr	Ser	Phe	Asn	Glu	Gly	225	230	235
Asn	Tyr	Lys	Met	Trp	Asp	Asp	Lys	Leu	Lys	Lys	Tyr	Met	Asp	Asp	Leu	245	250	255
Lys	Glu	Pro	Gly	Glu	Ser	Gln	Lys	Pro	Tyr	Ser	Ser	Arg	Tyr	Ile	Gly	260	265	270
Ser	Leu	Val	Gly	Asp	Phe	His	Arg	Thr	Leu	Leu	Tyr	Gly	Gly	Ile	Tyr			

275 280 285
 Gly Tyr Pro Arg Asp Ala Lys Ser Lys Asn Gly Lys Leu Arg Leu Leu
 290 295 300
 Tyr Glu Cys Ala Pro Met Ser Phe Ile Val Glu Gln Ala Gly Gly Lys
 305 310 315 320
 Gly Ser Asp Gly His Gln Arg Ile Leu Asp Ile Gln Pro Thr Glu Ile
 325 330 335
 His Gln Arg Val Pro Leu Tyr Ile Gly Ser Val Glu Glu Val Glu Lys
 340 345 350
 Leu Glu Lys Tyr Leu Ala
 355

<210> 2

<211> 1074

<212> DNA

<213> Spinacia oleracea L

<220> Fructose-1,6-bisphosphatase

<223>

<400> 2

gcagccgtag	gagaggcggc	tacagaaaca	aaggcaagga	ctagaagtaa	gtacgaaatt	60
gaaacactaa	caggctggct	gcttaaacaa	gaaatggcag	gtgttattga	tgctgaactt	120
accatcgttc	tttctagcat	ttcattggct	tgtaaacaaa	ttgcttcctt	ggttcaacga	180
gctgggtat	ctaaacttgac	tggaattcaa	ggtgctgtca	atatccaagg	agaggatcag	240
aagaaacttg	atgttgtctc	caatgaggtg	ttttcgagct	gcttgagatc	gagtgggaaga	300
acaggaataa	tagcatcaga	agaagaggat	gtaccagtgg	cagtgggaaga	gagttactct	360
ggaaactata	ttgtttgtgtt	tgatccactt	gatggttcat	ccaacattga	tcgagctgtc	420
tccactgggt	ccatctttgg	catttatagc	cctaacgatg	agtgcattgt	tgactctgat	480
cacgacgatg	agtcacagct	aagtgcagaa	gaacagaggt	gtgtagtgaa	tgtatgtcaa	540
ccaggggata	acctattagc	agcagggtat	tgtatgtact	caagctctgt	tatcttcgta	600
cttacaattg	gtaaagggtg	gtatgcattc	acattagatc	caatgtatgg	tgaattcgta	660
ctcacttcag	agaaaatcca	aatcccaaaa	gctgggaaga	tctattcatt	caatgaaggt	720
aactacaaaa	tgtgggatga	taaattgaag	aagtacatgg	atgatcttaa	agagccagga	780
gagtcacaga	aaccgtactc	gtctcgttac	atagggagtt	tagttgggga	ctttcataga	840
acacttttat	atgggtgggat	ttatggttac	ccaagagatg	caaagagtaa	gaatgggaaa	900
ttgaggcttt	tgtatgaatg	tgcacctatg	agttttattg	ttgaacaagc	tggtggtaaa	960
ggttctgatg	gtcatcaaag	aattcttgac	attcaacca	ccgagataca	tcaacgtgtg	1020
ccactgtaca	tcgggagtg	ggaggaagta	gagaaattag	agaagtactt	agca	1074

<210> 3

<211> 333

<212> PRT

<213> Spinacia oleracea L

<220> Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase

<223>

<400> 3

Val Asn Lys Ala Lys Asn Ser Ser Leu Val Thr Lys Cys Glu Leu Gly
 5 10 15
 Asp Ser Leu Glu Glu Phe Leu Ala Lys Ala Thr Thr Asp Lys Gly Leu
 20 25 30
 Ile Arg Leu Met Met Cys Met Gly Glu Ala Leu Arg Thr Ile Gly Phe
 35 40 45
 Lys Val Arg Thr Ala Ser Cys Gly Gly Thr Gln Cys Val Asn Thr Phe

50	55	60
Gly Asp Glu Gln Leu	Ala Ile Asp Val Leu	Ala Asp Lys Leu Leu Phe
65	70	75
Glu Ala Leu Asn Tyr	Ser His Phe Cys Lys Tyr	Ala Cys Ser Glu Glu
85	90	95
Leu Pro Glu Leu Gln	Asp Met Gly Gly Pro Val	Asp Gly Gly Phe Ser
100	105	110
Val Ala Phe Asp Pro	Leu Asp Gly Ser Ser Ile	Val Asp Thr Asn Phe
115	120	125
Ser Val Gly Thr Ile	Phe Gly Val Trp Pro Gly	Asp Lys Leu Thr Gly
130	135	140
Val Thr Gly Arg Asp	Gln Val Ala Ala Ala Met	Gly Ile Tyr Gly Pro
145	150	155
Arg Thr Thr Tyr Val	Leu Ala Leu Lys Asp Tyr	Pro Gly Thr His Glu
165	170	175
Phe Leu Leu Leu Asp	Glu Gly Lys Trp Gln His	Val Lys Glu Thr Thr
180	185	190
Glu Ile Asn Glu Gly	Lys Leu Phe Cys Pro Gly	Asn Leu Arg Ala Thr
195	200	205
Ser Asp Asn Ala Asp	Tyr Ala Lys Leu Ile Gln	Tyr Tyr Ile Lys Glu
210	215	220
Lys Tyr Thr Leu Arg	Tyr Thr Gly Gly Met Val	Pro Asp Val Asn Gln
225	230	235
Ile Ile Val Lys Glu	Lys Gly Ile Phe Thr Asn	Val Ile Ser Pro Thr
245	250	255
Ala Lys Ala Lys Leu	Arg Leu Leu Phe Glu Val	Ala Pro Leu Gly Phe
260	265	270
Leu Ile Glu Lys Ala	Gly Gly His Ser Ser Glu	Gly Thr Lys Ser Val
275	280	285
Leu Asp Ile Glu Val	Lys Asn Leu Asp Asp Arg	Thr Gln Val Ala Tyr
290	295	300
Gly Ser Leu Asn Glu	Ile Ile Arg Phe Glu Lys	Thr Leu Tyr Gly Ser
305	310	315
Ser Arg Leu Glu Glu	Pro Val Pro Val Gly Ala	Ala Ala
325	330	

<210> 4

<211> 999

<212> DNA

<213> *Spinacia oleracea* L

<220> Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase

<223>

<400> 4

gtgaacaagg caaagaactc ttccttgta accaaatgtg aacttggtga cagtttggag	60
gagttcctag caaaggcaac cacagataaa gggctgatta gattgatgat gtgcatggga	120
gaagcattaa ggaccattgg ctttaaagtg aggactgctt catgtggtgg aactcaatgt	180
gttaacacct ttggagacga acagcttgcc attgatgtgc ttgctgacaa gcttcctttc	240
gaggcattga actattcaca cttctgcaag tatgcttggtt cagaagaact ccctgagctt	300
caagatatgg gagggcccggt tgatggcgga ttcagtgtag catttgaccc ccttgatgga	360
tccagcattg tcgataccaa tttctcagtt gggaccatat tcgggggtttg gccaggtgac	420
aagctaactg gtgtaacagg cagagatcaa gtggctgctg caatgggaat ttatggtcct	480

出証特 2 0 0 5 - 3 0 3 0 8 3 3

			260					265					270				
Thr	Asp	Pro	Asp	Arg	Val	Tyr	Asp	Ala	Asn	Glu	Leu	Ala	Ser	Gly	Gln		
		275					280					285					
Glu	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Cys	Gly	Ile	Thr	Pro	Gly	Leu	Leu	Met	Glu		
	290					295					300						
Gly	Val	Arg	Phe	Phe	Lys	Gly	Gly	Ala	Arg	Thr	Gln	Ser	Leu	Val	Ile		
305					310					315					320		
Ser	Ser	Gln	Ser	Arg	Thr	Ala	Arg	Phe	Val	Asp	Thr	Val	His	Met	Phe		
				325				330					335				
Asp	Asp	Val	Lys	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Leu	Ile	Pro	Asp	Pro	Lys	Trp		
		340					345					350					
Arg	Pro	Glu	Arg														
		355															

<210> 6

<211> 1350

<212> DNA

<213> Synechococcus

<220> fructose-1,6-bisphosphatase/sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from Synechococcus PCC 7942

<400> 6

atcgcaacta	aagccagaga	tgtgaggagg	ggatccggcc	tttggttagac	tcaactgttg	60
gaatccccag	aagcaatcat	ccgtaaggag	tcaggacggc	gtggagaaga	cgatcgggtct	120
cgagattatt	gaagttgtcg	agcaggcagc	gatcgccctcg	gcccgcctga	tgggcaaagg	180
cgaaaagaat	gaagccgatc	gcgtcgcagt	agaagcgatg	cgggtgcgga	tgaaccaagt	240
ggaaatgctg	ggccgcatcg	tcatcgggtga	aggcgagcgc	gacgaagcac	cgatgctcta	300
tatcgggtgaa	gaagtgggca	tctaccgcga	tgcagacaag	cgggctggcg	taccggctgg	360
caagctgggtg	gaaatcgaca	tgcgccgttga	cccctgcgaa	ggcaccaacc	tctgcgccta	420
cggtcagccc	ggctcgatgg	cagtttttggc	catctccgag	aaaggcggcc	tgtttgcagc	480
tccccgacttc	tacatgaaga	aactggctgc	acccccagct	gccaaaggca	aagagacatc	540
aataaagtcc	gcgaccgaaa	acctgaaaat	tctctcggaa	tgtctcgatc	gcgccatcga	600
tgaattgggtg	gtcgtgggtca	tggatcgctc	ccgccacaaa	gagctaatacc	aagagatccg	660
ccaagcgggt	gcccgcgtcc	gtctgatcag	cgatgggtgac	gtttcggccg	cgatctcctg	720
cggttttgct	ggcaccaaca	cccacgccct	gatgggcatc	ggtgcagctc	ccgagggtgt	780
gatttcggca	gcagcaatgc	gttgccctcg	cgggcacttc	caaggccagc	tgatctacga	840
cccagaagtg	gtcaaaaccg	gcctgatcgg	tgaaagccgt	gagagcaaca	tcgctcgctt	900
gcaagaaatg	ggcatcaccg	atcccgatcg	tgtctacgac	gcgaacgaac	tggcttcggg	960
tcaagaagtg	ctgtttgcgg	cttgccggtat	caccccgggc	ttgctgatgg	aaggcgtgcg	1020
cttcttcaaa	ggcggcgctc	gcacccagag	cttggtgatc	tccagccagt	cacggacggc	1080
tcgcttcggt	gacaccgttc	acatgttcga	cgatgtcaaa	acggttagcc	tgccgttaat	1140
tcctgatccc	aaatggcggc	cggagcggta	gaacgggtat	agctcgatcg	cttcgggtcgt	1200
tgtttttcag	cgaatccatt	tgcgatcgct	tttcaaacc	ttttttcgtc	aaccttcttt	1260
aaacggcctc	atgcatctcg	cagttgtcgg	ctcagccatc	ggacagcacc	gg	1312

<210> 7

<211> 133

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> psbA promoter

<400> 7

agcttctaca	tacaccttgg	ttgacacgag	tatataagtc	atgttatact	gttgaataac	60
aagccttcca	ttttctattt	tgatttgtag	aaaactagtg	tgcttgggag	tccctgatga	120
ttaaataaac	caa					133

<210> 8

<211> 159

<212> DNA

<213> *Nicotiana tabacum*

<223> rps16 terminator

<400> 8

agcttgaaat	tcaattaagg	aaataaatta	aggaaataca	aaaagggggg	tagtcatttg	60
tatataactt	tgtatgactt	ttctcttcta	tttttttgta	tttcttccct	ttccttttct	120
atttgtattt	ttttatcatt	gcttccattg	aattactag			159

<210> 9

<211> 805

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<223> aadA

<400> 9

gatccatggc	tcgtgaagcg	gttatcgccg	aagtatcaac	tcaactatca	gaggtagttg	60
gcgtcatcga	gcgccatctc	gaaccgacgt	tgctggccgt	acatttgtac	ggctccgcag	120
tggatggcgg	cctgaagcca	cacagtgata	ttgatttgc	ggttacgggtg	accgtaaggc	180
ttgatgaaac	aacgcggcga	gctttgatca	acgacctttt	ggaaacttcg	gcttcccctg	240
gagagagcga	gattctccgc	gctgtagaag	tcaccattgt	tgtgcacgac	gacatcattc	300
cgtggcggtta	tccagctaag	cgcgaaactgc	aatttggaga	atggcagcgc	aatgacattc	360
ttgcaggtat	cttcgagcca	gccacgatcg	acattgatct	ggctatcttg	ctgacaaaag	420
caagagaaca	tagcgttgcc	ttggtaggtc	cagcggcgga	ggaactcttt	gatccgggtc	480
ctgaacagga	tctatttgag	gcgctaaatg	aaaccttaac	gctatggaac	tcgccgcccg	540
actgggctgg	cgatgagcga	aatgtagtgc	ttacgttgtc	ccgcatttgg	tacagcgcag	600
taaccggcaa	aatcgcgccg	aaggatgtcg	ctgccgactg	ggcaatggag	cgcctgccgg	660
cccagtatca	gcccgtcata	cttgaagcta	gacaggctta	tcttggacaa	gaagaagatc	720
gcttggcctc	gcgcgcagat	cagttggaag	aatttgtcca	ctacgtgaaa	ggcgagatca	780
ctaaggtagt	tggcaaataa	ctgca				805

<210> 10

<211> 4591

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> pLD6

<400> 10

gtggcacttt	tcgggggaaat	gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	60
caaatatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	120
ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	180
gccttcctgt	ttttgctcac	ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	240
tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	300
ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	360
tattatcccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggtcg	ccgcatacac	tattctcaga	420
atgacttggt	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	480
gagaattatg	cagtgctgcc	ataaccatga	gtgataaac	tgccggccaac	ttacttctga	540
caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	600
ctcgccttga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	660
ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	720

ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	780
ttctgcgctc	ggcccttccg	gctggctggt	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	840
gtgggtctcg	cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	900
ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	960
taggtgcctc	actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tataactttt	1020
agattgattt	aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	cttttttgata	1080
atctcatgac	caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	1140
aaaagatcaa	aggatcttct	tgagatcctt	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	1200
caaaaaaacc	accgctacca	gcggtggttt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	1260
ttccgaagg	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgtcctt	ctagtgtagc	1320
cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	1380
tcctgttacc	agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	1440
gacgatagtt	accggataag	gcgcagcgg	cgggctgaac	gggggggttcg	tgcacacagc	1500
ccagcttgga	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	1560
gcgccacgct	tcccgaagg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	1620
caggagagcg	cacgaggagg	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	1680
ggtttcgcca	cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	1740
tatggaaaaa	cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttctt	ggccttttgc	tggccttttg	1800
ctcacatgtt	ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	1860
agtgagctga	taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcgagtca	gtgagcgagg	1920
aagcgggaaga	gcgccaata	cgcaaaccgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	1980
gcagctggca	cgacaggttt	cccgactgga	aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	2040
tgagttagct	cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	2100
tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	2160
ccaagcgcgc	aattaaccct	cactaaaggg	aacaaaagct	ggagctccac	cgcggtggcg	2220
gccgctctag	ttggatttgc	tccccgcg	tcgttcaatg	agaatggata	agaggctcgt	2280
gggattgacg	tgagggggca	gggatggcta	tatttctggg	agcgaactcc	gggcgaattt	2340
gaagcgcttg	gatacagttg	tagggaggga	tccatggctc	gtgaagcgg	tatcgccgaa	2400
gtatcaactc	aactatcaga	ggtagttagc	gtcatcgagc	gccatctcga	accgacgttg	2460
ctggccgtac	atttgtacgg	ctccgcagtg	gatggcggcc	tgaagccaca	cagtgatatt	2520
gatttgctgg	ttacggtgac	cgtaaggctt	gatgaaacaa	cgcggcgagc	tttgatcaac	2580
gaccttttgg	aaacttcggc	ttcccctgga	gagagcgaga	ttctccgcgc	tgtagaagtc	2640
accattgttg	tgcacgacga	catcattccg	tggcgttata	cagctaagcg	cgaactgcaa	2700
tttgagagaat	ggcagcgcaa	tgacattctt	gcaggtatct	tcgagccagc	cacgatcgac	2760
attgatctgg	ctatcttgct	gacaaaagca	agagaacata	gcgttgcctt	ggtaggtcca	2820
gcggcgagg	aactctttga	tccggttcct	gaacaggatc	tatttgaggc	gctaaatgaa	2880
accttaacgc	tatggaactc	gccgcccgc	tgggctggcg	atgagcgaaa	tgtagtgtt	2940
acgttgtccc	gcatttggtg	cagcgcagta	accggcaaaa	tcgcgccgaa	ggatgtcgct	3000
gccgactggg	caatggagcg	cctgccggcc	cagtatcagc	ccgtcatact	tgaagctaga	3060
caggcttata	ttggacaaga	agaagatcgc	ttggcctcgc	gcgcagatca	gttggagaag	3120
tttgtccact	acgtgaaagg	cgagatcact	aaggtagttg	gcaaataact	gcaggatcct	3180
ggcctagtct	ataggagggt	ttgaaaagaa	aggagcaata	atcattttct	tgttctatca	3240
agagggtgct	attgctcctt	tctttttttc	tttttattta	tttactagta	ttttacttac	3300
atagactttt	ttgtttacat	tatagaaaaa	gaaggagagg	ttattttctt	gcattttattc	3360
atgattgagt	attctatttt	gattttgtat	ttgttttaaa	ttgtagaaat	agaacttggt	3420
tctcttcttg	ctaatgttac	tatatctttt	tgattttttt	tttccaaaaa	aaaatcaaat	3480
tttgacttct	tcttatctct	tatctttgaa	tatctcttat	ctttgaaata	ataatatcat	3540
tgaataaaga	aagaagagct	atattcgaag	cttctacata	caccttggtt	gacacgagta	3600
tataagtcat	gttataactgt	tgaataacaa	gccttccatt	ttctattttg	atttgtagaa	3660
aactagtgtg	cttgggagtc	cctgatgatt	aaataaacca	agatctaaaa	ggagaaatta	3720

```

agcatgctct agatcgatga attcgccctt ccgaagcttg aaattcaatt aaggaaataa 3780
attaaggaaa tacaaaaagg ggggtagtca tttgtatata actttgtatg acttttctct 3840
tctatttttt tgtatttcct ccctttcctt ttctatttgt atttttttat cattgcttcc 3900
attgaattac tagtcgacct cgagggggggg cccggtaccc aattcgccct atagttagtc 3960
gtattacgcg cgctcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt 4020
taccacaactt aatcgccctt cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga 4080
ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat gggacgcgcc 4140
ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgtacact 4200
tgccagcgcc ctagcgcccg ctcttttcgc tttcttcctt tcctttctcg ccacgttcgc 4260
cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 4320
acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtagtggt tcacgtagtg ggccatcgcc 4380
ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt 4440
gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat 4500
tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 4560
ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta g 4591

```

<210> 11

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> multi-cloning regions

<400> 11

```
ccaagatcta aaaggagaaa ttaagcatgc tctagatcga tgaattcgcc c 51
```

<210> 12

<211> 142

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> rrn promoter

<400> 12

```
ctagttggat ttgctcccc gccgtcgttc aatgagaatg gataagaggc tcgtgggatt 60
```

```
gacgtgaggg ggcagggatg gctataattc tgggagcgaa ctccgggcga atttgaagcg 120
```

```
cttgataca gttgtaggga gg 142
```

<210> 13

<211> 390

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> psbA terminator

<400> 13

```
gacctggcc tagtctatag gaggttttga aaagaaagga gcaataatca ttttcttggt 60
```

```
ctatcaagag ggtgctattg ctcttttctt tttttctttt tatttatatta ctagtatattt 120
```

```
acttacatag acttttttgt ttacattata gaaaaagaag gagaggttat tttcttgcat 180
```

```
ttattcatga ttgagtattc tattttgatt ttgtatttgt ttaaaattgt agaaatagaa 240
```

```
cttgtttctc ttcttgctaa tgttactata tctttttgat tttttttttc caaaaaaaaa 300
```

```
tcaaattttg acttcttctt atctcttctt tttgaatctc tcttatcttt gaaataataa 360
```

```
tatcattgaa ataagaaaga agagctatat 390
```

<210> 14

<211> 5581

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> pLD200

<400> 14

tcgcgcgttt	cggatgatgac	ggtgaaaacc	tctgacacat	gcagctcccc	gagacgggtca	60
cagcttgtct	gtaagcggat	gccgggagca	gacaagcccc	tcagggcgcg	tcagcgggtg	120
ttggcgggtg	tcggggctgg	cttaactatg	cggcatcaga	gcagattgta	ctgagagtgc	180
accatatgcg	gtgtgaaata	ccgcacagat	gcgtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgcc	240
attcgccatt	caggctgcgc	aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcggggc	tcttcgctat	300
tacgccagct	ggcgaaaggg	ggatgtgctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	360
tttcccagtc	acgacgttgt	aaaacgacgg	ccagtgaatt	catgagttgt	agggagggat	420
ttatgtcacc	acaaacagag	actaaagcaa	gtgttggatt	caaagctggg	gttaaagagt	480
acaaattgac	ttattatact	cctgagtacc	aaaccaagga	tactgatata	ttggcagcat	540
tccgagtaac	tcctcaacct	ggagttccac	ctgaagaagc	agggggcgcg	gtagctgccg	600
aatcttctac	tggtacatgg	acaactgtat	ggaccgatgg	acttaccagc	cttgatcggt	660
acaaagggcg	atgctaccgc	atcgagcgtg	ttgttggaga	aaaagatcaa	tatatgtctt	720
atgtagctta	cccttttagac	ctttttgaag	aaggttctgt	taccaacatg	tttacttcca	780
ttgtaggtaa	cgtatttggg	ttcaaagccc	tgcgcgctct	acgtctggaa	gatctgcgaa	840
tccctcctgc	ttatgttaaa	actttccaag	gtccgcctca	tgggatccaa	gttgaaagag	900
ataaattgaa	caagtatggg	cgtccctgtt	tgggatgtac	tattaaacct	aaattggggg	960
tatctgctaa	aaactacggg	agagccgttt	atgaatgtct	tcgcgggtgga	cttgatttta	1020
ctaaagatga	tgagaacgtg	aactcacaac	catttatgcg	ttggagagat	cgtttcttat	1080
tttgtgccga	agcactttat	aaagcacagg	ctgaaacagg	tgaaatcaaa	gggcattact	1140
tgaatgctac	tgcaggtaca	tgcgaagaaa	tgatcaaaag	agctgtatgt	gctagagaat	1200
tgggcgttcc	gatcgtaatg	catgactact	taacgggggg	attcaccgca	aatactagct	1260
tggctcatta	ttgccgagat	aatgggtctac	ttcttcacat	ccaccgtgca	atgcatgcgg	1320
ttattgatag	acagaagaat	catggatatc	acttccgggt	attagcaaaa	gcgttacgta	1380
tgtctgggtg	agatcatatt	cactctggta	ccgtagtagg	taaacttgaa	ggtgaaagag	1440
acataacttt	gggctttgtt	gattttactgc	gtgatgattt	tggtgaacaa	gatcgaagtc	1500
gcggtattta	tttacttcaa	gattgggtct	ctttaccagg	tgttctaccc	gtggcttcag	1560
gaggtattca	cgtttggcat	atgcctgctc	tgaccgagat	ctttggggat	gattccgtac	1620
tacagttcgg	tggaggaact	ttaggacatc	cttggggtaa	tgcgccagggt	gccgtagcta	1680
atcgagtagc	tctagaagca	tgtgtaaaag	ctcgtaatga	aggacgtgat	cttgctcagg	1740
aaggtaatga	aattattcgc	gaggcttgca	aatggagccc	ggaactagct	gctgcttggt	1800
aagtatggaa	agagatcgta	tttaattttg	cagcagtggg	cgtttttggat	aagtaaaaac	1860
agtagacatt	agcagataaa	ttagcaggaa	ataaagaagg	ataaggagaa	agaactcaag	1920
taattatcct	tcgttctctt	aattgaattg	caattaaact	cggcccaatc	ttttactaaa	1980
aggattgagc	cgaatacaac	aaagattcta	ttgcatatat	tttgactaag	tatatactta	2040
cctagatata	caagatttga	aatacaaaa	ctagaaaact	aaatcaaaa	ctaagactca	2100
aatctttcta	ttgttgtctt	ggatcgcggc	cgcgctagcg	tcgacgatcc	ttaggattgg	2160
tatatctttt	tctatcctgt	agtttgtagt	ttccctgaat	caagccaagt	atcacacctc	2220
tttctacca	tcctgtatat	tgtccccttt	gttccgtgtt	gaaatagAAC	cttaatttat	2280
tacttatttt	tttattaaat	tttagatttg	ttagtgatta	gatattagta	ttagacgaga	2340
ttttacgaaa	caattatttt	tttatttctt	tataggagag	gacaaatctc	ttttttcgat	2400
gcgaatttga	cacgacatag	gagaagccgc	cctttattaa	aaattatatt	atttttaaata	2460
atataaaggg	ggttccaaca	tattaatata	tagtgaagtg	ttcccccaga	ttcagaactt	2520
tttttcaata	ctcacaatcc	ttattagtta	ataatcctag	tgattggatt	tctatgctta	2580
gtctgatagg	aaataagata	ttcaaataaa	taattttata	gcgaatgact	attcatctat	2640
tgtattttca	tgcaaatagg	gggcaagaaa	actctatgga	aagatgggtg	tttaattcga	2700
tgttgtttta	gaaggagttc	gaacgcagggt	gtgggctaaa	taaatcaatg	ggcagtcctg	2760
gtcctattga	aaataccaat	gaagatccaa	atcgaaaagt	gaaaaacatt	catagttgga	2820
ggaatcgtga	caattctagt	tgcagtaatg	ttgattatgt	attcggcggt	aaagacattc	2880
ggaatttcat	ctctgatgac	acttttttag	ttagtgatag	gaatggagac	agttattcca	2940
tctattttga	tattgaaaat	catatttttg	agattgacaa	cgatcattct	tttctgagtg	3000

aactagaaag ttcttttttat agttatcgaa actcgaatta tcggaataat ggatttaggg 3060
gcgaagatcc ctactataat tcttacatgt atgataactca atatagttgg aataatcaca 3120
ttaatagttg cattgatagt tatcttcagt ctcaaactctg tatagatact tccattataa 3180
gtggtagtga gaattacggg gacagttaca tttatagggc cgtttgtggg ggtgaaagtc 3240
gaaatagtag tgaaaacgag ggttccagta gacgaactcg cacgaagggc agtgatttaa 3300
ctataagaga aagtttcta atgatctgacc tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg 3360
tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcaciaa ttccacaciaa catacgagcc 3420
ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatgtcg 3480
ttgcgctcac tgcccgcctt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc 3504
ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctgcctcact 3600
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggtg 3660
atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag 3720
caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc 3780
cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta 3840
taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 3900
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgct ttctcaatgc 3960
tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtg gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac 4020
gaaccccccg ttcagccccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac 4080
ccggtaaagc acgacttate gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg 4140
aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga 4200
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcgga aaagagttgg 4260
agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag 4320
cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct 4380
gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg 4440
atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 4500
gagtaaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc 4560
tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg ttagataaac tacgatacgg 4620
gagggttac catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct 4680
ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaaggggcc agcgcagaag tggctcctgca 4740
actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 4800
ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg 4860
tcgtttggta tggcttcatt cagctccggg tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc 4920
cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag 4980
ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg 5040
ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 5100
tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat 5160
agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg 5220
atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca 5280
gcatctttta ctctcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca 5340
aaaaaggga taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat 5400
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag 5460
aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa 5520
gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt 5580
c 5581

<210> 15

<211> 1434

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> rbcL

<400> 15

atgtcaccac	aaacagagac	taaagcaagt	gttggattca	aagctggtgt	taaagagtac	60
aaattgactt	attatactcc	tgagtaccaa	accaaggat	actgatata	ggcagcattc	120
cgagtaactc	ctcaacctgg	agttccacct	gaagaagcag	gggccgcggt	agctgccgaa	180
tcttctactg	gtacatggac	aactgtatgg	accgatggac	ttaccagcct	tgatcgttac	240
aaagggcgat	gctaccgcat	cgagcgtgtt	gttggagaaa	aagatcaata	tattgcttat	300
gtagcttacc	ctttagacct	ttttgaagaa	ggttctgtta	ccaacatgtt	tacttccatt	360
gtaggtaacg	tatttgggtt	caaagccctg	cgcgctctac	gtctggaaga	tctgcgaatc	420
cctcctgctt	atgttaaaac	tttccaaggt	ccgcctcatg	ggatccaagt	tgaaagagat	480
aaattgaaca	agtatggtcg	tcccctgttg	ggatgtacta	ttaaacctaa	attgggggta	540
tctgctaata	actacggtag	agccgtttat	gaatgtcttc	gcggtggact	tgattttact	600
aaagatgatg	agaacgtgaa	ctcacaacca	tttatgcgtt	ggagagatcg	tttcttattt	660
tgtgccgaag	cactttataa	agcacaggct	gaaacagggt	aatcaaagg	gcattacttg	720
aatgctactg	caggtacatg	cgaagaaatg	atcaaaagag	ctgtattttg	tagagaattg	780
ggcgttccga	tcgtaatgca	tgactactta	acggggggat	tcaccgcaaa	tactagcttg	840
gctcattatt	gccgagataa	tggtctactt	cttcacatcc	accgtgcaat	gcatgcggtt	900
attgatagac	agaagaatca	tggtatccac	ttccgggtat	tagcaaaagc	gttacgtatg	960
tctggtggag	atcatattca	ctctggtacc	gtagtaggta	aacttgaagg	tgaaagagac	1020
ataacttttg	gctttgttga	tttactgcgt	gatgattttg	ttgaacaaga	tcgaagtcgc	1080
ggatatttatt	tcactcaaga	ttgggtctct	ttaccagggt	ttctaccctg	ggcttcagga	1140
ggatattcacg	tttggcatat	gcctgctctg	accgagatct	ttgggggatga	ttccgtacta	1200
cagttcgggtg	gaggaacttt	aggacatcct	tggggtaatg	cgccagggtgc	cgtagctaata	1260
cgagtagctc	tagaagcatg	tgtaaaagct	cgtaatgaag	gacgtgatct	tgctcaggaa	1320
ggtaatgaaa	ttattcgcga	ggcttgcaaa	tggagcccgg	aactagctgc	tgcttgtgaa	1380
gtatggaaag	agatcgtatt	taattttgca	gcagtggacg	ttttggataa	gtaa	1434

<210> 16

<211> 705

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> accD

<400> 16

aatgactatt	catctattgt	attttcatgc	aaataggggg	caagaaaact	ctatggaaag	60
atggtggttt	aattcgatgt	tgtttaagaa	ggagttcgaa	cgcagggtgtg	ggctaaataa	120
atcaatgggc	agtcttggtc	ctattgaaaa	taccaatgaa	gatccaaatc	gaaaagtga	180
aaacattcat	agttggagga	atcgtgacaa	ttctagttgc	agtaatgttg	attattttatt	240
cggcgttaaa	gacattcgga	atttcatctc	tgatgacact	tttttagtta	gtgataggaa	300
tggagacagt	tattccatct	attttgatat	tgaaaatcat	atttttgaga	ttgacaacga	360
tcattctttt	ctgagtgaac	tagaaagtgc	tttttatagt	tatcgaaact	cgaattatcg	420
gaataatgga	tttaggggcg	aagatcccta	ctataattct	tacatgtatg	atactcaata	480
tagttggaat	aatcacatta	atagttgcat	tgatagttat	cttcagtctc	aatctgtat	540
agatacttcc	attataagtg	gtagtgagaa	ttacgggtgac	agttacattt	atagggccgt	600
ttgtggtggt	gaaagtcgaa	atagtagtga	aaacgagggt	tccagtagac	gaactcgcac	660
gaagggcagt	gatttaacta	taagagaaag	ttctaataat	ctcga		705

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<223> polylinker

<400> 17

cgcgccgcg ctagcgtcga c

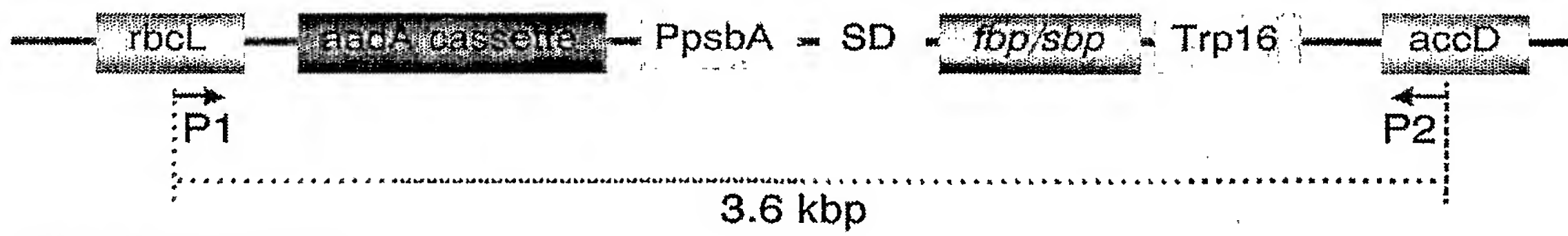
<210> 18
<211> 7
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<223> Shine-Dalgarno Sequence
<400> 18
aggaggu

7

【書類名】 図面

【図 1】

transformants

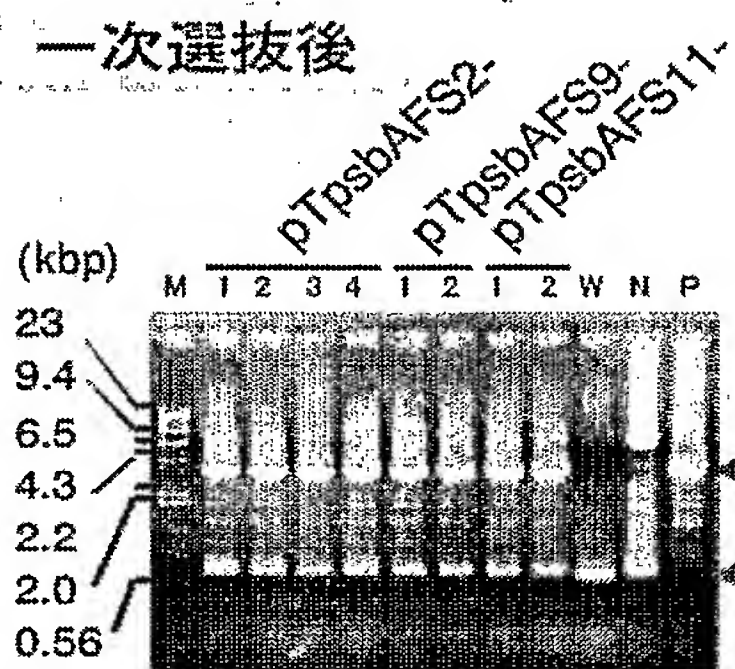


Wild-type plants

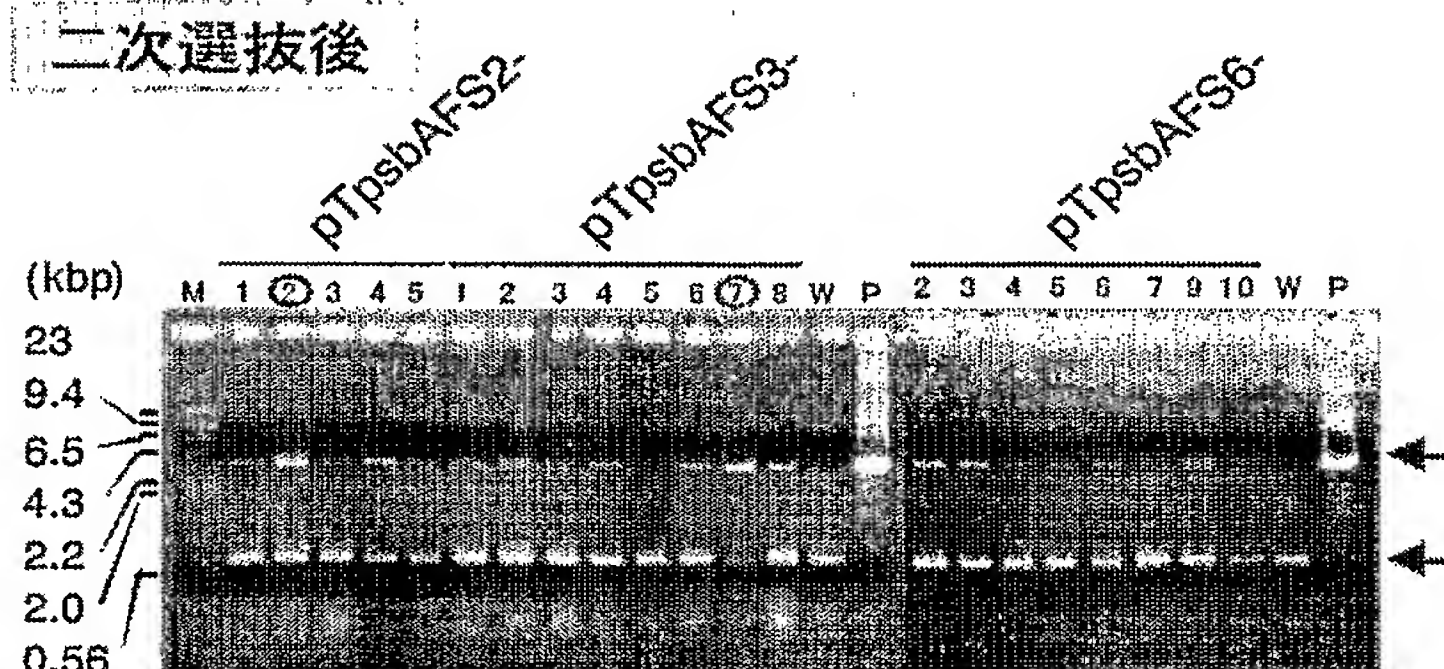


【図 2】

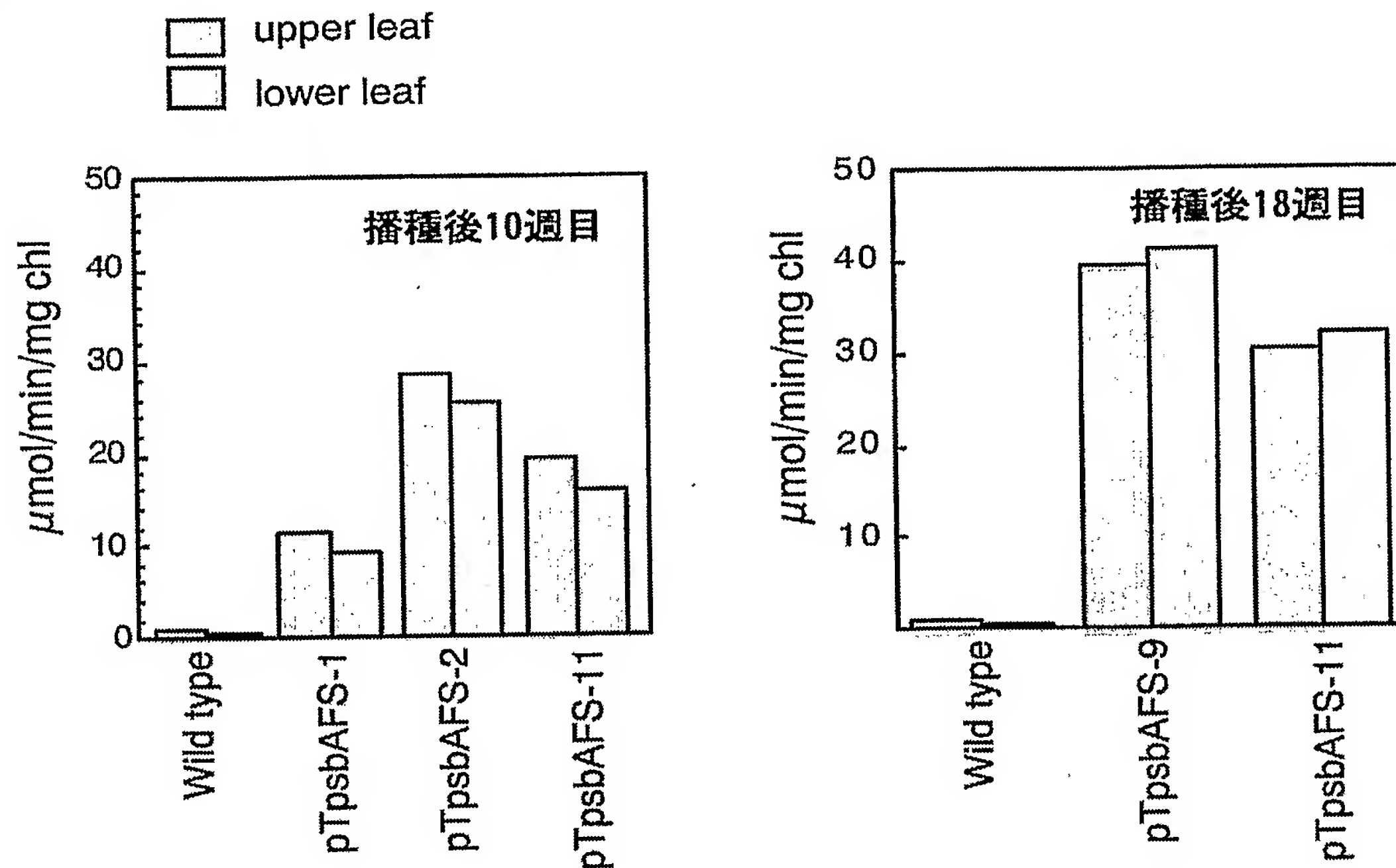
一次選抜後



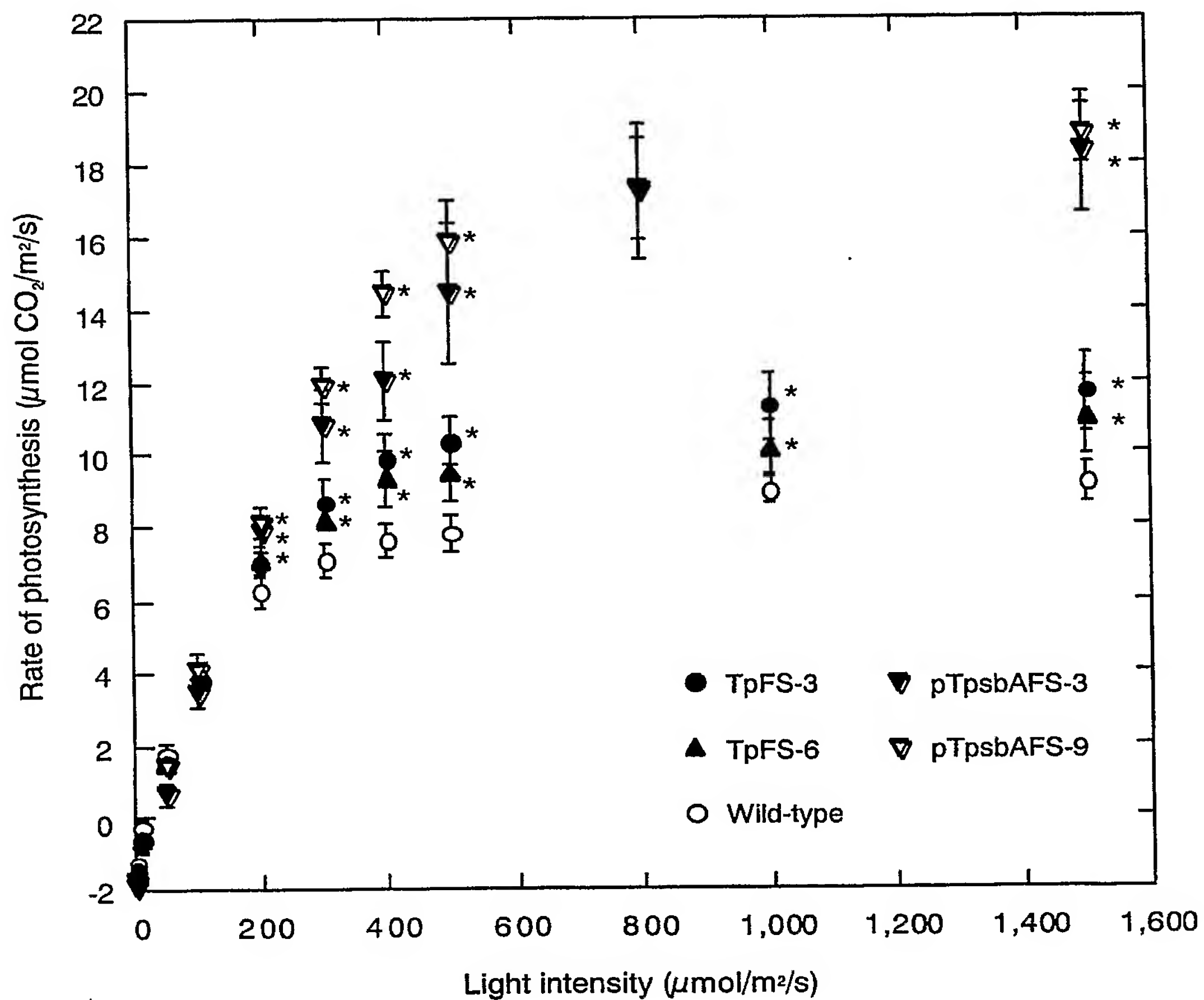
二次選抜後



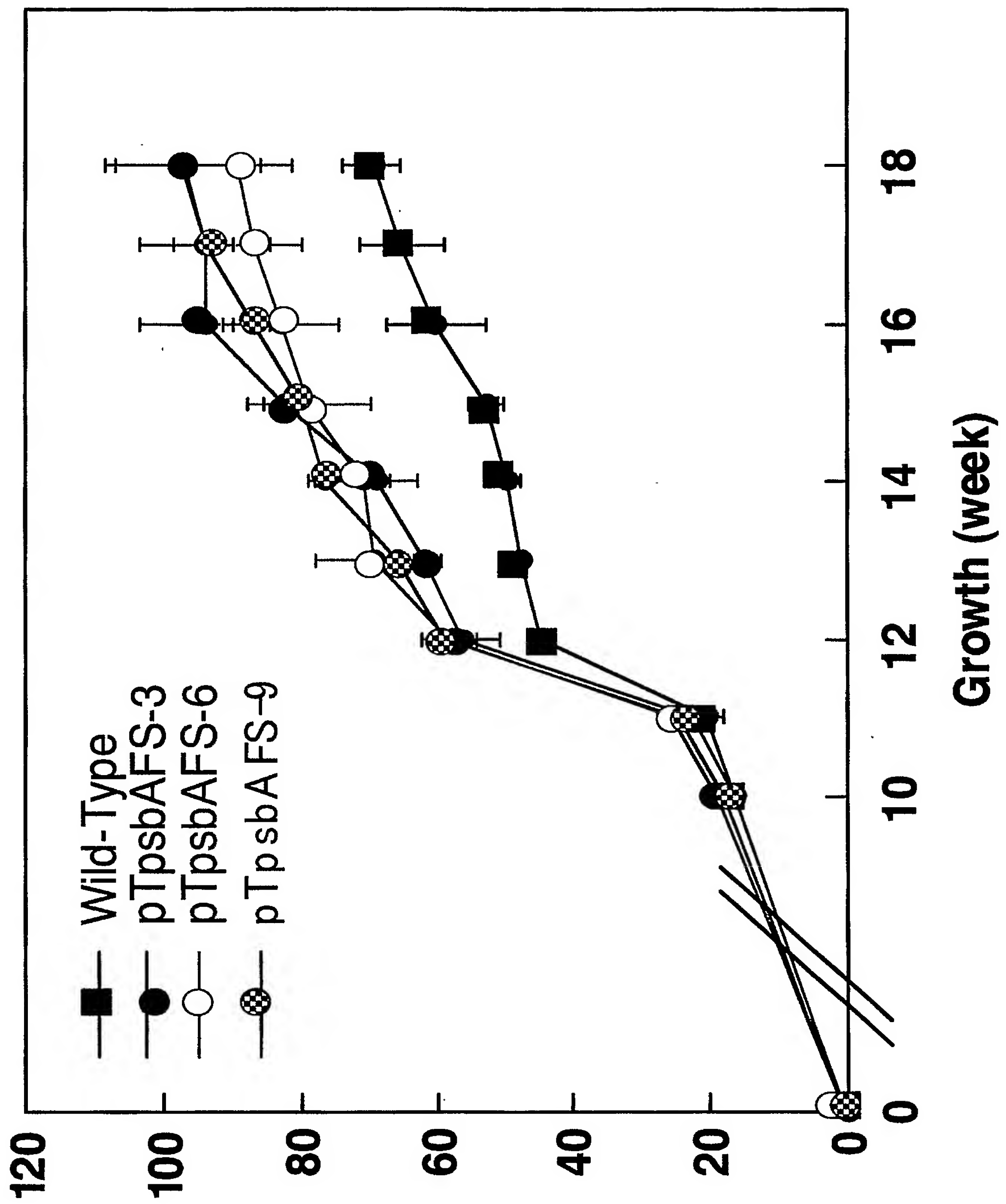
【図 4】



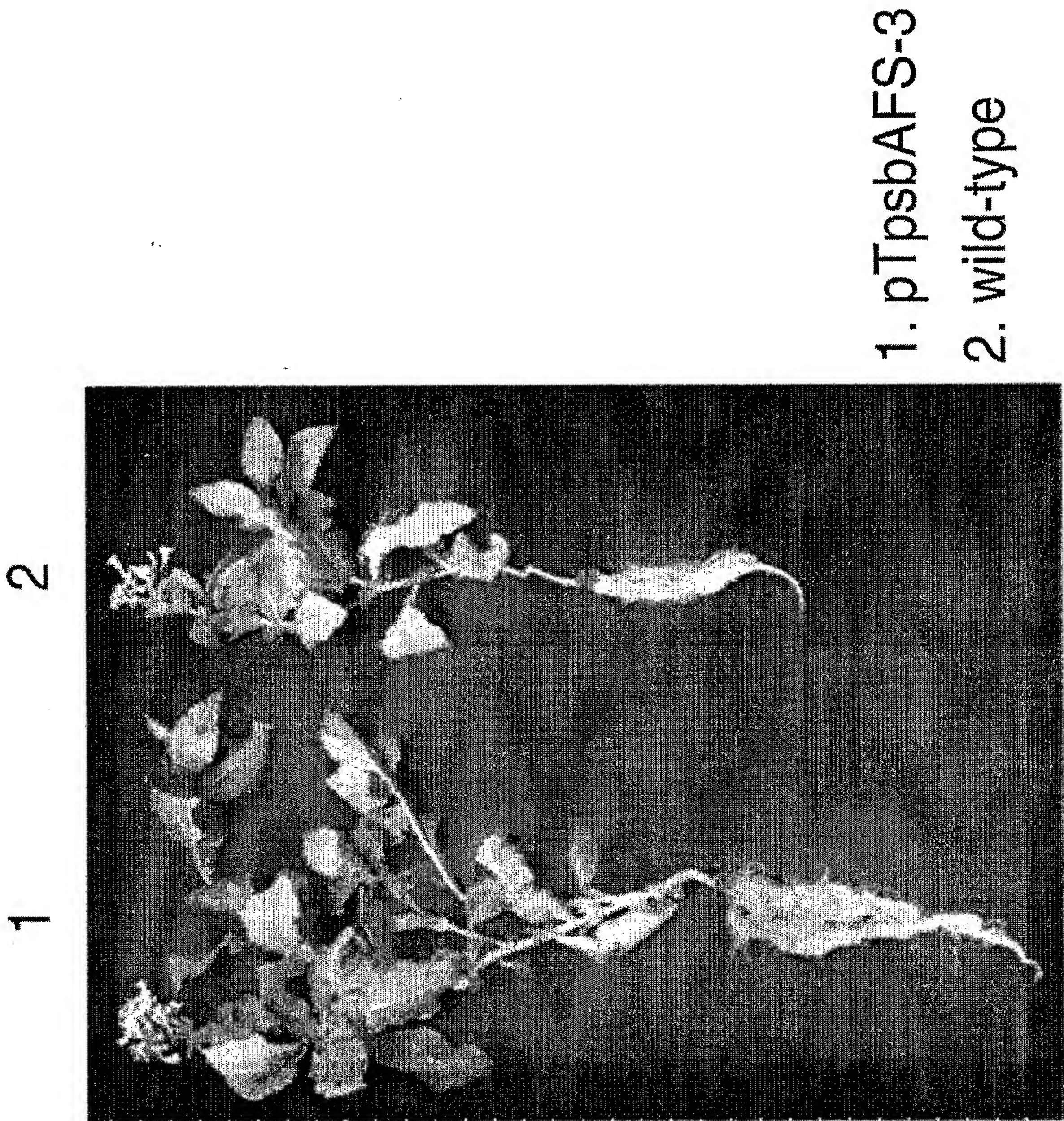
【図 5】



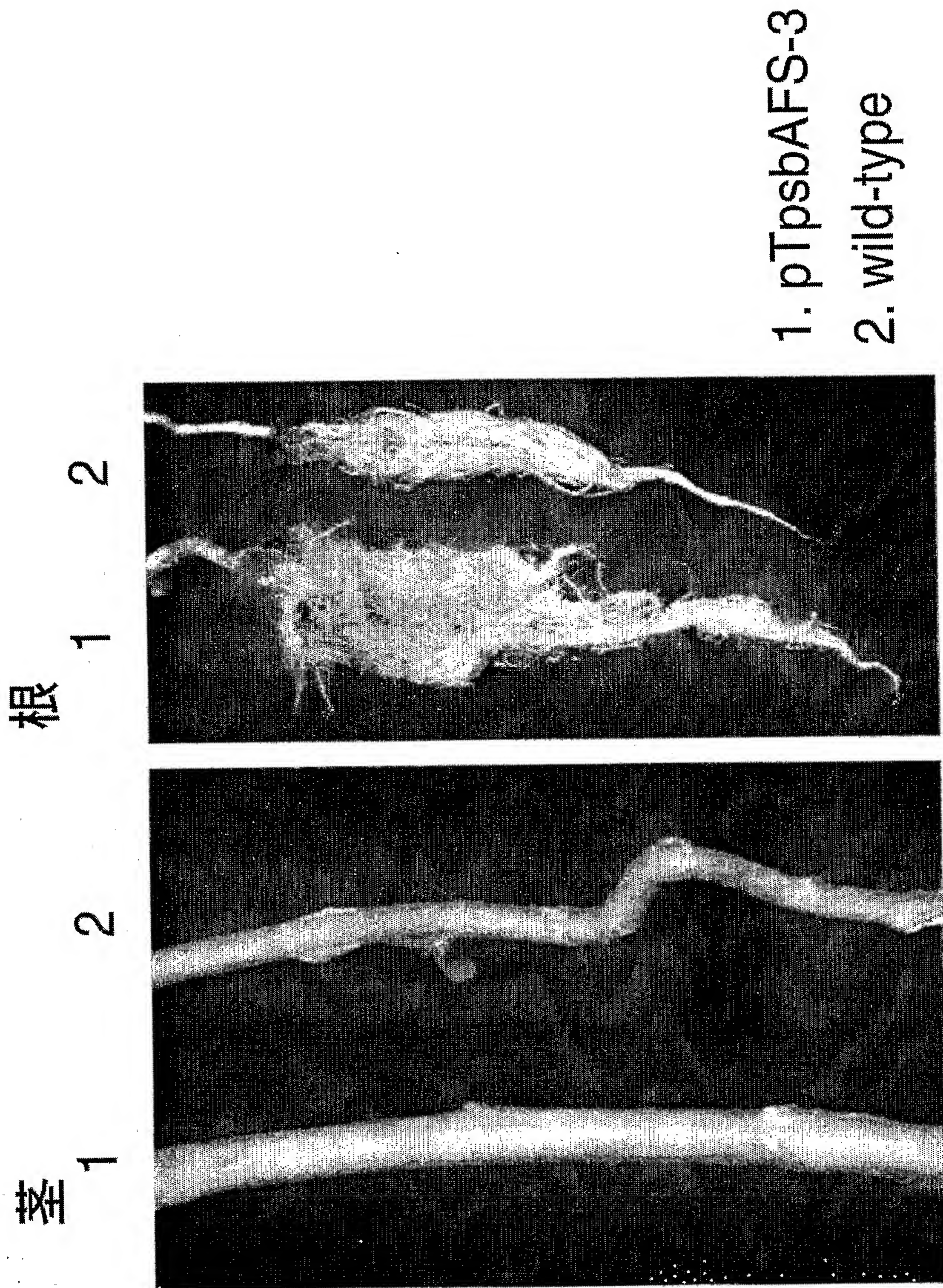
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の課題は、高等植物中で葉緑体工学によって特定の遺伝子を形質発現させることによって、野生株に比べ高い光合成活性を持ち、生育及び生産性が促進される形質転換植物にあって、花粉による導入遺伝子の拡散の恐れが無い形質転換植物とすることである。

【解決手段】 葉緑体遺伝子 *r b c L* の相補的塩基配列と葉緑体遺伝子 *a c c D* の間にフルクトースー 1, 6 - ビスホスファターゼ又は／及びセドヘプツロースー 1, 7 - ビスホスファターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む DNA フラグメントを含んだ光合成活性を高める発現カセットを有する遺伝子組み換えベクターを用いて形質転換植物とする。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届（一般承継）
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2004- 59513
【承継人】
【識別番号】 504143441
【氏名又は名称】 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学
【代表者】 鳥居 宏次
【連絡先】 部署名 研究協力部 研究協力課 産官学推進室
担当者 岡田 比呂志
電話番号 0 7 4 3 - 7 2 - 5 9 3 0 （直通）
1 5 文科会第 1 9 9 9 号に基づく承継

【その他】

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 1 3
受付番号	5 0 4 0 1 0 5 5 1 0 8
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	神田 美恵 7 3 9 7
作成日	平成 1 6 年 7 月 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 6月23日

特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 8 1 6 9 4 5 7]

1 . 変更年月日

1 9 9 8 年 1 2 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5

氏 名

奈良先端科学技術大学院大学長

特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 1 1 7 8 0 1 2]

1 . 変更年月日

1 9 9 3 年 9 月 2 4 日

[変更理由]

住所変更

住 所

京都府相楽郡木津町木津川台 9 丁目 2 番地

氏 名

財団法人地球環境産業技術研究機構

特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 2 5 3 4 7]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府東大阪市小若江 3 丁目 4 番 1 号

氏 名

学校法人近畿大学

特願 2 0 0 4 - 0 5 9 5 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 4 1 4 3 4 4 1]

1. 変更新月日 2 0 0 4 年 4 月 9 日

[変更新理由] 新規登録

住 所 奈良県生駒市高山町 8 9 1 6 - 5

氏 名 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学